

ERGEBNISSE VON IN VITRO VERSUCHEN
ÜBER DEN CHLORID- UND P-AMINOHIPPURSAURE-
(PAH-) TRANSPORT
AN DER HAUT VON RANA ESCULENTA

WALTER SCHNEIDER

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ERGEBNISSE VON IN VITRO VERSUCHEN
ÜBER DEN CHLORID- UND P-AMINOHIPPURSÄURE- (PAH-) TRANSPORT
AN DER HAUT VON RANA ESCULENTA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät Physik
der
Ludwig-Maximilians-Universität in München

vorgelegt von
Walter Schneider
aus
Speyer/Rhein

November 1972

I. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Deetjen
II. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schober
Tag der mündlichen Prüfung: 8. 2. 1973



Meinen Eltern gewidmet

Mein Dank gilt:

Herrn Dir. Prof. Dr. K. Kramer, daß ich diese Arbeit in
seinem Institut durchführen konnte,
Herrn Prof. Dr. P. Deetjen, für die Unterstützung der Arbeit,
Fräulein G. Ruhland, für ihre fleißige und qualifizierte
Assistenz,
Herrn Dr. D. Häberle, für die Diskussionen,
Herrn Feinmechanikermeister W. Klotz und den Herren seiner
Werkstatt, für die saubere Arbeit bei der Herstellung der
Kammer und der Küvettenhalterung, und
Fräulein R. Firlus, für die Reinschrift der Arbeit.

<u>A</u>	<u>Einleitung</u>	1
<u>B</u>	<u>Methodik</u>	8
I	Kammeraufbau	8
II	Lösungen	13
III	Flußmessungen	16
1	Messung unidirektionaler Tracer-Flüsse	16
2	Simultane Messung zweier gleichgerichteter Tracer-Flüsse (z. B. ^{36}Cl - und ^3H -PAH-Influx bzw.-Efflux)	19
3	Simultane Messung zweier entgegengerichteter Tracer-Flüsse (z. B. ^{22}Na -Influx und ^{24}Na -Efflux)	21
4	Flußbestimmung nach der Methode der direkten Photometrie (z. B. unidirektionale PAH-Flüsse)	23
IV	Messung der Zellinnenkonzentration von austauschbarem Cl ($[\text{Cl}]^*_{\text{ICV}}$)	25
V	Untersuchungen in Na-freien Lösungen	26
<u>C</u>	<u>Ergebnisse</u>	28
I	Untersuchungen des PAH-Transportes	28
1	Konzentrationsabhängigkeit der unidirektionalen PAH-Flüsse	28
2	Temperaturabhängigkeit der PAH-Flüsse	30
3	Spannungsabhängigkeit der PAH-Flüsse	31
II	Untersuchungen des Cl-Transportes	34
1	Messungen in Na-haltigen Lösungen (Na = 105 meq/l)	34
a	Konzentrationsabhängigkeit der unidirektionalen Cl-Flüsse	34
b	Beziehungen zwischen Cl-Influx und SCC	41

c	Beziehung zwischen Netto-Na-Transport und SCC	44
d	Aktivierungsenergien der Flüsse ϕ_{13} (0.5/105), ϕ_{13} (83/105) und ϕ_{31} (83/105)	46
e	Austauschbare Cl-Zellinnenkonzentration Cl ICV	48
f	Simultane Messung von gleichgerichteten Cl- und PAH-Flüssen	49
2	Messungen in "Na-freien" Lösungen (Na = 0.04 - 0.08 meq/l)	51
a	Verlauf von OCV und SCC beim Behandeln der Haut mit Na-freien" Lösungen	52
b	Abhängigkeit zwischen SCC und Cl-Konzentration	55
c	Berechnung der Flüsse ϕ_{13} (83/0), ϕ_{31} (83/0)	59
d	Beziehungen zwischen Netto-Cl-Transport und SCC	61
<u>D</u>	<u>Diskussion</u>	63
<u>E</u>	<u>Berechnungen</u>	83
I	Kammervolumenbestimmung nach der Verdünnungsmethode	85
II	Berechnung von ϕ und P	84
1	nicht stationäre Verhältnisse	85
2	stationäre Verhältnisse	86
III	Berechnung der Aktivierungsenergie	88
IV	Bestimmung der wahren ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten aus den Impulsraten zweier Zählkanäle	89
V	Berechnung von ϕ nach der Methode der direkten Photometrie	91
<u>F</u>	<u>Zusammenfassung</u>	94
<u>G</u>	<u>Literatur</u>	97

Abkürzungen, die im Laufe der Arbeit Anwendung finden:

SCC	short circuit current = Kurzschlußstrom
OCV	open circuit voltage = Leerlaufspannung
PD	Potentialdifferenz
L	elektrische Leitfähigkeit
$\phi_{ij}(X)$	unidirektionaler Fluß (Influx: $ij = 13$, Efflux: $ij = 31$) des Teilchens X weitere Erklärungen s.S.17
$\phi_{ij}^N(X)$	Netto-Fluß des Teilchens X: $\phi_{ij}^N(X) = \phi_{ij}(X) - \phi_{ji}(X)$
$E_{ij}(X)$	Aktivierungsenergie des Flusses $\phi_{ij}(X)$
E	elektrodenasymmetrischespotential
ECV	Extrazellulärraum
ICV	Intrazellulärraum
κ	spezifische Leitfähigkeit
ADH	Antidiuretisches Hormon
DNP	2,4- Dinitrophenol
JAA	Jodazetessigsäure
KCN	Kaliumzyanid

A Einleitung

Die belebte Materie unterscheidet sich von der unbelebten darin, daß sie auf die Schaffung und -wenigstens zeitweilige- Erhaltung von lebenden Organismen, Strukturen hohen Ordnungsgrades hinausläuft; Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von Energie und einfachen Grundbausteinen. In der Biosynthese dieser Organismen werden nicht nur die Makromoleküle, wie z.B. die Proteine, Nukleinsäuren, Stärke, Lipide aufgebaut und erhalten, sondern diese auch zusammengelagert zu Zellorganellen, wie z. B. Mitochondrien, Ribosomen, Membranen usw.. Je nach Zusammensetzung dieser Strukturelemente zu höheren Struktureinheiten, den Zellen, sind diese zu ganz speziellen Leistungen fähig. Die Summe der Leistungen aller verschiedenen Zellen, aus denen sich ein Organismus zusammensetzt, dient letzten Endes seiner Erhaltung.

Ganz unabhängig von ihrer speziellen Funktion sind alle Zellen dadurch gekennzeichnet, daß sie in permanentem thermodynamischem Ungleichgewicht mit ihrer Umgebung, dem Extrazellulärraum stehen.

Es ist sowohl von praktischem als auch von theoretischem Interesse, die Tatsachen und Grundlagen zu erforschen, welche mit dieser Fähigkeit der Zellen zusammenhängen, nämlich ihren entropiearmen Zustand gegenüber ihrer Umwelt in Form eines Fließgleichgewichts zu behaupten. Eine der "anti-entropischen" Kräfte, mit deren Hilfe die Zelle ihre Aufgabe erfüllt, ist z. B. der aktive Transport: Unter Aufwendung von Zell-Stoffwechselenergie wird z. B. über die Zellplasmamembran, also zwischen Intra- und Extrazellulärraum, ein Konzentrationsgradient eines oder mehrerer Teilchen aufgebaut, ohne daß die dazu nötige Arbeit durch die herrschenden elektrochemischen Kräfte allein erklärbar wäre; dieses Ungleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Elektrolyt- bzw. Nichtelektrolytkonzentration einer Zelle ist entweder die Folge ihrer oder die Voraussetzung für ihre Funktion.

Wenn auch in jeder Zelle des pflanzlichen oder tierischen Organismus wenigstens ein solcher aktiver Transport nachzuweisen

oder zu postulieren ist, so gibt es doch wenige Objekte, an denen er unter relativ einfachen, physikalisch und chemisch definierten Bedingungen studiert werden kann; unter diesen wenigen Möglichkeiten bietet sich die Amphibienhaut, z. B. die des Frosches, an, von der bereits seit Du Bois-Reymond (1848) bekannt ist, daß sie in vivo eine Potentialdifferenz besitzt. Ussing (1949) interpretierte diese Erscheinung als die Folge des an dieser Haut stattfindenden, aktiven Na-Transportes und erfand gleichzeitig eine Methode, die sog. Kurzschlußstrommethode, mit deren Hilfe er auch den Beweis dafür erbrachte.

Mehr als 20 Jahre intensiver Forschung an diesem Epithel hat seitdem viele Details über den aktiven Na-Transport offengelegt, ohne daß man heute behaupten könnte, er sei völlig verstanden: Zwar steht fest, daß sich der transepitheliale Na-Transport aus mindestens zwei Einzelschritten, einem passiven und einem aktiven, zusammensetzt, doch gibt es bis heute kein allgemein akzeptiertes Na-Transportmodell, aus dem die genauere Charakterisierung und die Lokalisation der einzelnen Transportschritte hervorgeht; zwar hat man erkannt, daß eine stöchiometrische Korrelation besteht zwischen dem Sauerstoff-Verbrauch der Haut und der Zahl der Na-Ionen, die sie pro Zeit transportiert (ein Maß dafür ist der Kurzschlußstrom, d. h. der Strom, der durch die Hautfläche fließt, wenn ihre Leerlaufspannung zu Null kompensiert wird), aber noch gibt es keine klaren Vorstellungen über den Mechanismus, nach welchem die Transformation von chemischer Energie in osmotische Arbeit stattfindet; zwar hat man unzählige pharmakologische Beeinflussungen (Inhibition oder Aktivierung) des Na-Transportes beobachtet, doch ist man über den molekularen Mechanismus dieser Vorgänge völlig im Unklaren, usw..

Die Untersuchungen über aktive Transportprozesse, wie z. B. die der Froschhaut, besitzen aber auch praktisches Inter-

esse. Es ist bekannt, daß die Amphibienhaut an der Regulation des Wasser- und Elektrolytgehaltes des betreffenden Tieres beteiligt ist; insofern gibt es die berechnete Hoffnung, zwischen diesem Epithel und den Nierenepithelien von Kalt- und Warmblütern einige Gemeinsamkeiten zu entdecken; damit könnte man diese Haut mit gewissen Einschränkungen als eine "Modell-Membran" betrachten. Der Nutzen einer solchen Erkenntnis liegt auf der Hand.

Die bisherigen Untersuchungen an beiden Epithelien haben tatsächlich Parallelitäten zwischen der Froschhaut und einem Teil der Nierenfunktionseinheit, dem distalen Tubulus, gefunden. Diese bestehen z. B. darin, daß sie beide eine Potentialdifferenz gleicher Richtung und Größenordnung zeigen, beide einen aktiven Na-Transport besitzen, beide zur Wasserstoff-Ionen-Sekretion befähigt sind, beide in ähnlicher Weise auf das wasserretinierende, antidiuretische Hormon (ADH) reagieren, usw..

Der distale Tubulus scheint schließlich auch zu einem aktiven Cl-Transport befähigt zu sein (Rektor 1962, Burg 1972), und es gibt auch an der Froschhaut Anhaltspunkte für einen aktiven Cl-Transport. Uns scheint jedoch der Beweis dafür nur mit Einschränkungen erbracht worden zu sein. (s.n.).

Gelänge es, die Existenz dieses Transportes an der Froschhaut tatsächlich nachzuweisen, wäre 1. eine weitere Parallelität zwischen Froschhaut und distalem Tubulus aufgedeckt und 2. hätte man in der Froschhaut eine ideale Struktur gefunden, um einen Anionentransport, speziell den des Chlorids, auf ähnlich einfache Art und Weise zu studieren, wie dies in unzähligen Untersuchungen für das Kation Na^+ mit großem Erfolg geschah.

Literaturübersicht:

In vivo Messungen des Cl-Transportes am Froschepithel ergaben, daß z. B. an *R. esculenta*, *R. temporaria*, *Calyptocephallaea gayi* eine vom aktiven Na-Transport unabhängige aktive Cl-Aufnahme existiert, die von der Außen- zur Innenseite orientiert ist. (Krogh 1937, Jørgensen 1954, Garcia-Romeu et al. 1969).

Bei in vitro Messungen des Cl-Transportes fanden Koefoed-Johnsen et al. (1952), daß die beiden Cl-Flüsse an der isolierten Haut die Ussingsche Fluß-Relation erfüllen, d. h. ihre Größe durch die herrschenden elektrochemischen Kräfte erklärt werden kann. Zudem war von Ussing und Zerahn (1951) festgestellt worden, daß innerhalb der Fehlerbreite von 5 - 10 % eine Identität zwischen Netto-Na-Transport und SCC besteht. Andererseits fanden Zadunaisky und DeFisch (1964) z. B. an der isolierten Haut des südamerikanischen Frosches *Leptodactylus ocellatus* gerade auf Grund einer meßbaren Diskrepanz zwischen Kurzschlußstrom und Netto-Na-Transport einen parallel zu ihm orientierten aktiven Cl-Transport.

Martin (1964) und Martin und Curran (1967) stellten dagegen am isolierten Epithel von *R. esculenta* fest, daß in Lösungen mit geringer Cl-Konzentration (2 meq/l) beim Übergang von Na-haltigen zu Na-freien Lösungen eine Vorzeichenumkehr der trans-epithelialen Potentialdifferenz (reversed potential) erfolgte. Gleichzeitig fanden sie mit Hilfe von Tracermessungen in Na-haltigen (Na = 100 meq/l) Lösungen bei kleinen Cl-Konzentrationen einen Netto-Cl-Influx, der durch Gabe von DNP oder JAA vergiftbar war. Dieser Fluß machte ca. 2.5 % des simultan gemessenen SCC aus. Bei höheren Cl-Konzentrationen wurde kein Netto-Cl-Fluß gefunden.

Erlj (1971) fand an der isolierten Haut der *Rana* Spezies bei kleineren Cl-Konzentrationen (2 meq/l), daß 1. der Cl-Influx um ein vielfaches größer ist als der Cl-Efflux, und 2., daß Amilorid den Na-Transport hemmt ohne den Cl-Transport zu verändern, während umgekehrt Azetazolamid ohne meßbare Änderung

des SCC den Cl-Influx blockiert. Der Netto-Cl-Fluß ist so klein, daß der SCC im wesentlichen dem Netto-Na-Fluß äquivalent ist. Bei Adaptation der Frösche in destilliertem Wasser fand er deutlich höhere Netto-Cl-Influxe (bis zu $36 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), als wenn die Frösche -wie üblich- in Leitungswasser aufbewahrt wurden.

Aus den Untersuchungen von Huf (1972) geht hervor, daß der Netto-Cl-Influx an der isolierten Haut von *R. esculenta* bei Cl-Konzentrationen von 4 meq/l auf beiden Seiten und unter Kurzschlußbedingungen etwa 10 % des Kurzschlußstromes ausmacht, bei Cl-Konzentrationen von 100 meq/l verschwindet oder sogar -allerdings statisch insignifikant- negativ wird.

Schließlich fand auch Kristensen (1972) an der isolierten Haut von *R. temporaria* nur im Bereich niedriger Cl-Konzentrationen (1 - 2 meq/l) einen Netto-Cl-Influx. Dieser wurde beim Übergang von Na-haltigen (Na = 105 meq/l) zu Na-freien Lösungen im Mittel um 10 % gemindert und durch simultane Anwesenheit von Amilorid (Epithelseite) und Ouabain (Koriumseite) nicht beeinträchtigt. Aus der völligen Blockierung des Netto-Cl-Influsses durch Gabe von DNP und KCN wurde geschlossen, daß das Cl aktiv transportiert wird. Weiter wurde auf Grund von Cl-Pool-Messungen vorgeschlagen, den aktiven Schritt des Cl-Transportes auf der "outward facing membrane" zu lokalisieren. Angaben über Cl-Flüsse bei höheren Cl-Konzentrationen fehlen.

Problemstellung:

Also kann, im Gegensatz zu dem Netto-Cl-Influx bei großen Cl-Konzentrationen, der Netto-Cl-Influx bei kleinen Cl-Konzentrationen als gesichert angesehen werden, zudem wurde in einigen dieser aufgeführten Arbeiten angedeutet, daß dieser Cl-Transport von dem parallel orientierten und gleichzeitig ablaufenden aktiven Na-Transport unabhängig ist. Da das flüssige Milieu, in dem sich der Frosch bisweilen aufhält,

nur sehr geringe Konzentrationen an NaCl besitzt ($< 1 \text{ mM/l}$), war es sinnvoll, sich bei den Untersuchungen des Cl-Transportes zunächst auf kleine Cl-Konzentrationen zu beschränken. Aus mehreren Gründen ist man jedoch auch an entsprechenden Untersuchungen bei hohen Cl-Konzentrationen ($70 - 110 \text{ meq/l}$) bzw. im Konzentrationsbereich $0 - 110 \text{ meq/l}$ interessiert, denn 1. gibt die Art der Abhängigkeit des Cl-Transportes von der Cl-Konzentration einen gewissen Aufschluß über den Mechanismus dieses Transportes, 2. wählt man beim Studium bestimmter Transporte zur Vermeidung passiver Substanzbewegungen auf der Korium- und Epithelseite identische Lösungen, deren Zusammensetzung der der interstitiellen Flüssigkeit angepaßt ist (Na 105, Cl 74, HCO_3 25 meq/l, Conway 1957), 3. beziehen sich sehr viele Aussagen bzgl. des Na-Transportes auf hohe NaCl-Konzentrationen ($100 - 110 \text{ meq/l}$), so daß in diesem Bereich die Beeinflussung z. B. der elektrischen Parameter (SCC, OCV) durch die Anwesenheit von Cl genauer bekannt sein sollte, als dieses auf Grund der bisher verfügbaren Literatur der Fall ist.

Es war somit ein Ziel der vorliegenden Untersuchungen an der Haut von *R. esculenta*, mit Hilfe von Tracerexperimenten die Abhängigkeit der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse von der Cl-Konzentration der Badlösungen zu messen; aus diesen Beziehungen sollte die Abhängigkeit des Netto-Cl-Influsses von der Cl-Konzentration berechnet und die Frage entschieden werden, in welchem Konzentrationsbereich ein von Null signifikant verschiedener Netto-Cl-Influx existiert.

Es sollte weiter untersucht werden, ob dieser Cl-Transport auf eine Wechselwirkung mit dem gleichsinnig orientierten aktiven Na-Transport oder mit anderen Ionenflüssen zurückzuführen ist oder als ein unabhängiger Prozeß betrachtet werden muß.

Nachdem -wie oben angegeben- in Na-haltigen Lösungen zumindest in einem bestimmten Cl-Konzentrationsbereich ein Netto-

Cl-Ionenfluß existiert und dieser auch in Lösungen mit geringer Na-Konzentration nicht verschwindet, wollten wir schließlich die Frage untersuchen, ob in Na-freien Lösungen die Größen OCV und SCC positiv bleiben bzw. dem Wert Null zustreben oder ob sie negativ werden: Wäre letzteres der Fall, würde daraus folgen, daß die von Ussing und anderen Autoren vermutete Identität von SCC und Netto-Na-Transport entsprechend modifiziert werden müßte. Außerdem wäre ein spezieller Befund interessant, nämlich der, daß sich eine Identität von negativem SCC und Netto-Cl-Transport herausstellt. Damit wäre der Beweis erbracht, daß es sich bei dem Netto-Cl-Transport um einen primär aktiven Prozeß handelt. Würde demgegenüber eine Diskrepanz zwischen beiden Größen gefunden werden, so könnte aus der Richtung der Abweichung von der Identität auf weitere transepitheliale Netto-Ionen-Transporte zurückgeschlossen werden, die entweder mit dem Cl-Transport in Wechselwirkung stehen oder von ihm unabhängig sind.

Mit den Messungen von austauschbaren Zellinnenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Cl-Konzentration im Inkubationsmedium und der Bestimmung von Aktivierungsenergien der einzelnen Cl-Flüsse wollten wir einigen Aufschluß über das Transportmodell des Cl-Transportes erhalten.

Die Untersuchungen über den PAH-Transport sollen zeigen, welche anderen Transporteigenschaften ein organisches, größeres Anion gegenüber dem Cl an der Froschhaut zeigt. Anhand dieser Untersuchungen führen wir eine neue Methode zur Flußmessung organischer Substanzen ein, nämlich die Methode der direkten Photometrie.

B Methodik

Alle Messungen führten wir an der isolierten Haut von *R. esculenta* während aller Jahreszeiten durch. Aus den vergleichenden Studien von Huf (1972) an *R. esculenta*, *R. temporaria*, *R. pipiens* und *R. catesbiana* geht hervor, daß die von uns gewählte Froschspezies die beste Reproduzierbarkeit von OCV, SCC und L (= SCC/OCV) zeigte, wenn auf der Epithel- und/oder Koriumseite Lösungswechsel von Sulfat- und Cl-Ringerlösungen erfolgten.

B I Kammeraufbau

Wir verwendeten eine Meßanordnung, die im wesentlichen der von Ussing und Zerahn (1951) angegebenen entspricht; sie ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Das benötigte Meßvolumen

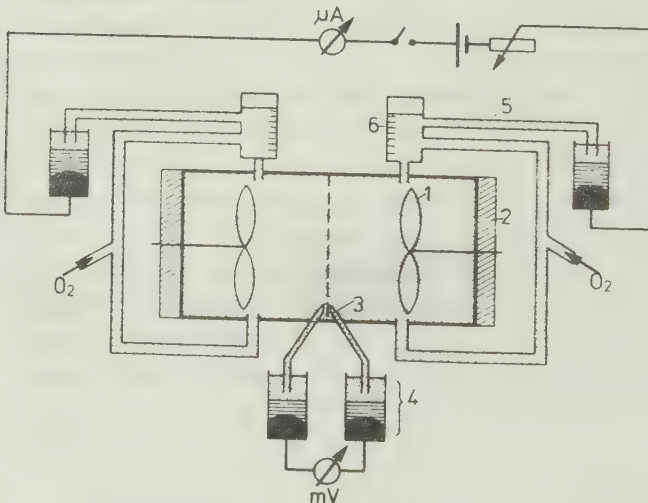


Abb. 1: Schematischer Kammeraufbau,
Erklärung im Text

pro Kammerhälfte betrug 5,7 ml, die Fläche der eingespannten Haut war $5,34 \text{ cm}^2$. Die beiden Volumina wurden während des ganzen Versuchs mit O_2 gesättigt, mit Rührern (1) konstanter Geschwindigkeit durchmischt und standen über eine Silberplatte (s.u.) mit zwei Flüssigkeitsräumen (2) in

thermischem Kontakt, die mit thermostatisierter Flüssigkeit durchströmt wurden. Wenn nicht anders erwähnt, betrug die Temperatur der Kammerflüssigkeiten während der Messungen 24-23 °C. In dem graduierten Überlaufgefäß (6) wurde die durch das Einleiten von O₂-Gas zirkulierende Kammerflüssigkeit oxygeniert; in ihm konnte eine Abschätzung des zugehörigen Kammervolumens mit einer Genauigkeit von etwa 0,1 ml erfolgen. außerdem wurden ihm die Flüssigkeitsproben zur Analyse entnommen.

Der Abgriff der spontanen transepithelialen Potentialdifferenz (Leerlaufspannung, OCV) erfolgte ganz nahe an der Haut (je ca. 0.5 mm) über zwei mit 3 M/l KCl gefüllte, zur Spitze ausgezogene Glaskapillaren mit dem Spitzendurchmesser von ca. 10 µ (3) (Konstruktion s. Abb. 2), die mit zwei Kalomelelektroden (4) in elektrischem Kontakt standen. Asymmetriepotentiale dieser Spannungsmeßelectroden wurden zwischen den ein-

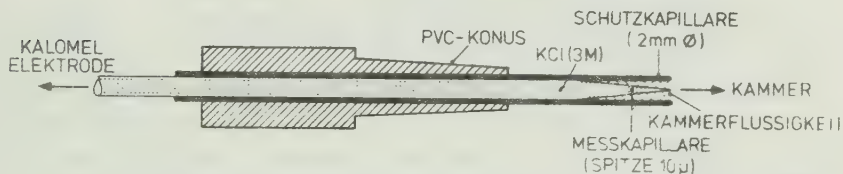


Abb. 2: Aufbau der verwendeten Spannungsmeßelectroden

zelnen Versuchsphasen durch Kurzschließen in der jeweils verwendeten Lösung geprüft. Bei frisch angefertigten Elektroden waren sie für die Dauer von einigen Tagen konstant < 1 mV.

Das Anlegen der externen Spannung zur Kompensation der OCV und somit zur Messung des Kurzschlußstroms geschieht üblicherweise mit reversiblen Ag-AgCl-Elektroden; tauchen sie direkt in die Kammerlösungen, so spielen sich an diesen Elektroden Prozesse ab, in denen Cl-Ionen der Kammerflüssigkeit umgesetzt werden. Um zu vermeiden, daß dadurch die Cl-Flußmessung beeinträchtigt wird, standen die verwendeten Kalomel-Elektroden über je eine

Flüssigkeitsbrücke (5) mit der jeweiligen Kammerlösung in elektrischer Verbindung.

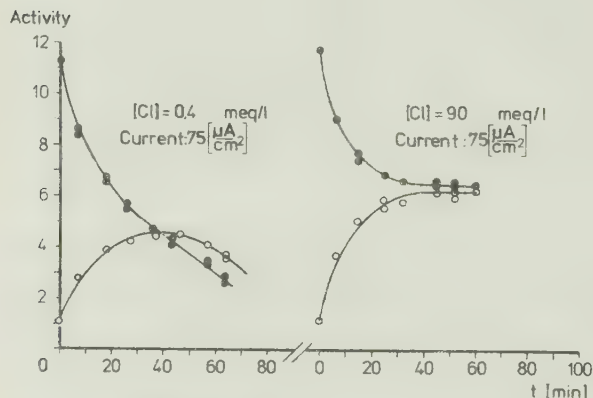


Abb. 3: Abhängigkeit der ^{36}Cl -Diffusion durch eine 2 mm lange Bohrung mit 0.9 mm Durchmesser von der spezifischen Aktivität. Der Strom wird über zwei in die Lösung eintauchende Ag-AgCl-Elektroden angelegt.

- : Aktivitätsverlauf auf der zur Zeit $t = -1$ "heißen" Seite.
- : Aktivitätsverlauf auf der zur Zeit $t = -1$ "kalten" Seite.

In Abb. 3 wird gezeigt, daß die eben genannten Elektrodenprozesse je nach verwendeter Cl-Konzentration bzw. spezifischer Cl-Aktivität unterschiedlich ins Gewicht fallen: hier sieht man die Aktivitätszu- bzw. abnahme in den beiden Kammerhälften, wenn die Lösung 0/105 (linkes Diagramm) oder 90/105 (rechtes Diagramm) verwendet und in die Lösung der einen Seite zur Zeit $t = -1$ ^{36}Cl hinzupipettiert wurde. Als Diffusionshindernis zwischen beiden Kammerhälften diente eine 2 mm lange Bohrung von 0.9 mm Durchmesser. Gleichzeitig schickten wir über die Ag-AgCl-Elektroden einen Strom von $75 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ durch die Kammer; dabei war die Elektrode auf der ursprünglich nicht aktiven Seite positiv gepolt. Aus dem Vergleich der beiden Diagramme geht hervor, daß bei Lösungen niedriger Cl-Konzentration (hoher spezifischer

Aktivität) im Gegensatz zu den Lösungen hoher Cl-Konzentration (niedriger spezifischer Aktivität) eine Abscheidung von ^{36}Cl an der Anode zu beobachten ist.

Den angenäherten Wert der Leitfähigkeit L der eingespannten Froschhaut errechneten wir aus dem Quotienten $L = \text{SCC}/\text{OCV}$.

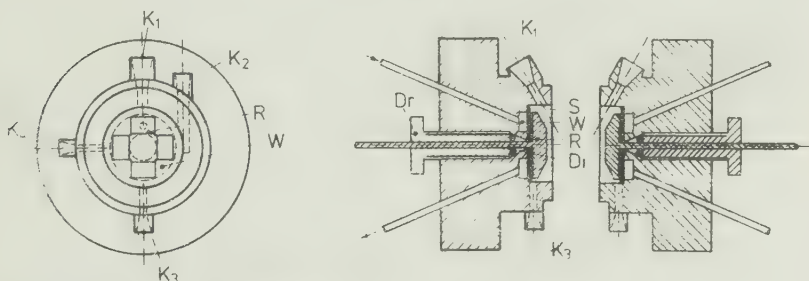


Abb. 4: Kammerkonstruktion
Erklärung im Text

Eine detaillierte Zeichnung der Kammer ist in Abb. 4 zu erkennen. Über die Silberplatte (S), die für spezielle Fälle im chlorierten Zustand auch als "Stromelektrode" dienen kann, findet die Thermostatisierung der Kammerflüssigkeiten statt. Das Wasser-Glycerin-Gemisch aus dem Kryostaten gelangt über V2A Stutzen in ein kreisförmig gebogenes, an diese Silberplatte angelötetes Silberrohr (W), durchströmt es und fließt zum Kryostaten zurück. K_1 ist der Konus, in den die Spannungselektrode eingeführt wird. Mit Hilfe der Druckschraube (D) und dem O-Ring (D_i) wird die in die Kammer eingeführte Rührerachse abgedichtet. Zwischen K_3 und K_4 zirkuliert die Kammerlösung durch das Überlaufgefäß; in K_2 sitzen Thermosonden zur Kontrolle der Kammer- bzw. Hauttemperatur.

Abb. 5 zeigt die schematische Darstellung der Kammer, mit der die fortlaufende Flußmessung organischer Moleküle, soweit sie im sichtbaren oder UV-Bereich absorbieren, direkt photometrisch erfolgte. (Die Flüssigkeitsniveaus der beiden Überlaufgefäße befinden sich in praxi auf gleicher Höhe und sind nur aus zeichentechnischen Gründen unterschiedlich hoch dargestellt.)

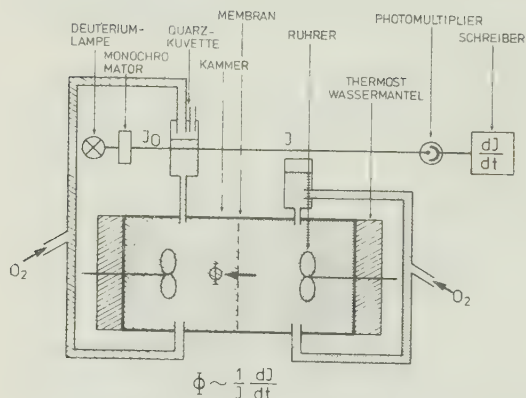


Abb. 5: Schematischer Kammraufbau zur Flußmessung nach der Methode der direkten Photometrie.

Das linke Überlaufgefäß besteht aus einer Quarzküvette (innen 10×10 mm) mit Ablaufstutzen (Fa. Hellma). Der Monochromator liefert Licht variabler Wellenlänge und Intensität I_0 ; es durchsetzt die Küvette und wird entsprechend der Konzentration an absorbierender Substanz in der Kammerflüssigkeit auf die Intensität I geschwächt; diese wird im Photomultiplier (XP 1003, Fa. Volvo) in einen Photostrom transformiert und dessen Spannungsabfall an einem Arbeitswiderstand auf dem Schreiber registriert.

Außer der Küvette, die in der Bohrung eines PVC-Zylinders (Abb. 6) lichtdicht untergebracht ist, verläuft der Strahlengang vom Monochromator bis zum Photomultiplier in einem Messingrohr. Der Zylinder besitzt in verschiedener Höhe, um 90° voneinander versetzt, zwei Bohrungen, durch die zwei Lichtstrahlen geeigneter Wellenlänge geschickt werden können. Damit besteht prinzipiell die Möglichkeit, den Fluß von zwei Substanzen durch Photometrie bei zwei verschiedenen Wellenlängen simultan zu messen.

In den Versuchen, in denen die Kammerlösungen auch auf niedrigere Temperaturen gebracht werden, besteht die Gefahr, daß sich die Küvettenflächen beschlagen. Um das zu vermeiden, kann über das an den Boden des Zylinders anschraubbare Teil

Schnitt AB

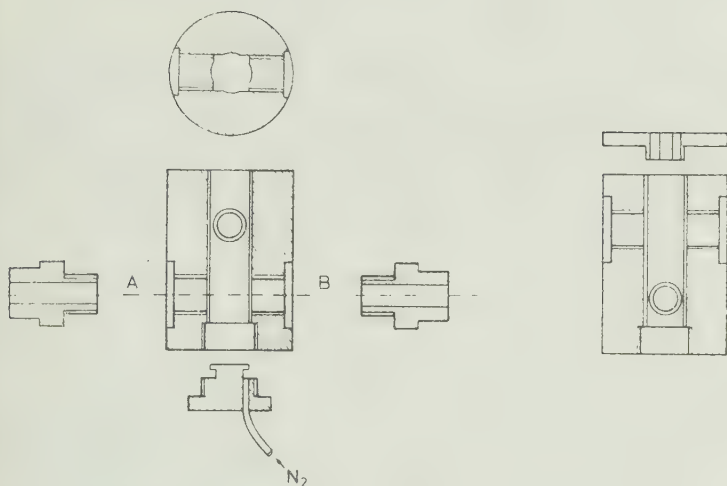


Abb. 6: Küvettenhalterung

getrocknetes N_2 -Gas zum gleichmäßigen Belüften der Küvettenoberflächen eingeleitet werden.

Durch die eine der zwei Bohrungen im Deckel des Zylinders gelangt die durch eingeleitetes O_2 -Gas zirkulierende Kammerflüssigkeit in die Küvette zurück, die andere Bohrung dient der Entlüftung.

B II Lösungen

Die Zusammensetzung, die Osmolarität, pH-Wert, spezifische Leitfähigkeit und Ionenstärke der für die Cl-Versuche verwendeten Lösungen zeigt Tabelle Ia. Hervorzuheben ist, daß sie kein Bikarbonat enthalten; der pH-Wert war während der einzelnen Versuchsphasen konstant. Bei Lösungen, in denen Cl teilweise oder ganz durch SO_4 bzw. NO_3 ersetzt wurde, stimmten die gemessenen Osmolaritäten mit den aus der Einwaage ermittelten überein. Deshalb mußte keine "Kompensation" der Osmolarität durch Glucose oder Mannitol vorge-

nommen werden, wie es in Arbeiten von Huf (1972) und Ferreira (1968) beschrieben wurde.

Designation		Cl/Na 0/105	Cl/Na 90/105	Designation		Cl/Na 2/0	Cl/Na 90/0
K ₂ SO ₄	mM/l	1	1	K ₂ SO ₄	mM/l	1	1
CaSO ₄	mM/l	1	1	CaSO ₄	mM/l	1	1
MOPS*	mM/l	10	10	TRIS**	mM/l	10	10
NaOH	mM/l	6	6	HCl	mM/l	8	8
NaCl	mM/l	--	90	Cholin-Cl	mM/l	82	82
Na ₂ SO ₄	mM/l	49.5	4.5	AgNO ₃ ***	mM/l	88	--
Mannitol	mM/l	61	16	Mannitol	mM/l	34	34
κ	$\frac{mS}{cm}$	8.85	10.8	κ	$\frac{mS}{cm}$	7.95	8.59
Osm.	mosm/l	225 - 235	225 - 235	Osm.	mosm/l	225 - 235	225 - 235
pH		7.3	7.3	pH		7.3	7.3
Ionic strength	M/l	0.161	0.116	Ionic strength	M/l	0.100	0.100
				Na	mM/l	0.082	0.036

Tabelle Ia: Lösungszusammensetzung und physikalische Eigenschaften der verwendeten Lösungen zur Messung der Cl-Flüsse.

- + Good-buffer, Morpholinopropansulfonacid (pk₂₀ = 7.2), Fa. SERVA
- ++ TRIS(hydroxymethyl)aminomethan
- +++ zur Fällung von Cl⁻

Durch Mischen adäquater Volumina der Lösungen 90/105 und 0/105 bzw. 90/0 und 2/0 haben wir Lösungen verschiedener Cl-Konzentrationen hergestellt. Die Bestimmung der chemischen Cl-Konzentrationen erfolgte titrimetrisch mit Hilfe eines Chloridometers der Fa. Buchler-Cotlove. Gegenüber der Messung mit der Cl-Elektrode hat diese Methode den Vorteil, daß sie ein von der jeweiligen Ionenstärke unabhängiges Ergebnis liefert.

Da der Puffer MOPS (bzw. TRIS) als Säure (bzw. Lauge) vorliegt, erfolgte eine Titration auf den pH-Wert 7,3 mit NaOH (bzw. HCl). Da weder Cholin-sulfat noch Cholin-nitrat verfügbar waren, wurde die Lösung 2/0 durch Titration mit AgNO_3 aus der Lösung 90/0 gewonnen. Die in der Tabelle Ia angegebenen Na-Konzentrationen ergeben sich aus Verunreinigungen von Cholin-sulfat und AgNO_3 . Die Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften der für die PAH-Versuche verwendeten Lösungen gehen aus Tabelle Ib hervor. Lösung 0 und

Designation		PAH 0	PAH 20	PAH/Cl/Na 0/0/106	PAH/Cl/Na 20/90/106
K_2SO_4	mM/l	1	1	1	1
CaSO_4	mM/l	-	-	-	-
MOPS	mM/l	10	10	10	10
PAH	mM/l	0	20	0	20
NaOH	mM/l	6	26	6	26
NaCl	mM/l	90	90	--	90
Na_2SO_4	mM/l	5	--	50	--
Mannitol	mM/l	25	--	75	--
κ	$\frac{\text{mS}}{\text{cm}}$	9,80	11,17	9,42	11,17
osm.	mosm/l	235 - 245	235 - 245	235 - 245	235 - 245
pH		7,3	7,3	7,3	7,3
Ionic strength	M/l	0,117	0,122	0,162	0,122

Tabelle Ib: Lösungszusammensetzung und physikalische Eigenschaften der verwendeten Lösungen zur Messung von PAH- (0,20) bzw. PAH- und Cl-Flüssen (0/0/106, 20/90/106).

+ siehe Tabelle Ia.

20 werden für unidirektionale PAH-Flußmessungen verwendet; die Lösungen 0/0/106 bzw. 20/90/106 zur simultanen Messung von Cl- und PAH-Flüssen. Lösungen unterschiedlicher PAH-

Konzentration wurden durch Mischen der angegebenen Stammlösungen hergestellt. Die PAH-Konzentrationen der Stammlösungen ermittelten wir entweder nach der Methode von Bratton und Marshall (1939) oder direkt photometrisch (s. III 4).

B III Flußmessungen

B III 1 Messung unidirektionaler Tracer-Flüsse

Eine Übersicht über die physikalischen Eigenschaften der von uns im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nuklide gibt Tabelle II. Entsprechend der üblichen Einteilung von intrazellulärem Raum, epithel- und koriumseitiger Lösung in die Kompartimente

Nuklid	Halbwertszeit	Zerfallsart	β - Strahlung		γ - Strahlung En. in MEV	β - Reichweite in H ₂ O	Kehrwert d. spez. Aktivität
			E _{max} MEV	E _β MEV			
³ H	12,36 a	β ⁻	0,018	0,005	-	0,007	103
¹⁴ C	5568 a	β ⁻	0,156	0,049	-	0,24	218 · 10 ³
³⁶ Cl	2,85 · 10 ⁵ a	β ⁻ , Ef	0,71	0,247	-	2,7	30,5 · 10 ⁶
²² Na	2,58 a	β ⁺ , Ef, γ	0,54	0,188	1,28; 0,51	2,1	106
²⁴ Na	15 s	β ⁺ , γ	1,39	0,55	2,75; 1,37	6,4	0,113

Tabelle II: Physikalische Eigenschaften der verwendeten Radionuklide

β⁺ Positronen- bzw. Elektronenemission

γ Gammastrahlung

Ef Einfang von Hüllenelektronen

E_{max} Max. β-Energie in MEV

E_β Mittelwert der Energie aller pro Zerfallsakt emittierten β-Strahlen

2, 1 und 3 geben wir den unidirektionalen transepithelialen In- bzw. Outfluxen die tiefgestellten Symbole 13 bzw. 31, und fügen den aus der Differenz zweier Flüsse unterschiedlicher Richtung errechneten Netto-Flüssen zusätzlich ein hochgestelltes N bei. Zu den Flüssen geben wir in Klammern Substanzkonzentrationen in meq/l an. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir Flüsse von drei verschiedenen Teilchen gemessen, die wir mit folgenden Symbolen kennzeichnen wollen (ij = 13 oder 31):

Eine genauere Ermittlung der beiden Volumina erhielten wir am Ende eines Versuches oder einer Phase aus der schrittweisen Verdünnung der in ihnen enthaltenen Aktivität oder einer vorher eingebrachten inerten Substanz (Berechnung s. E I).

Nach Abschluß einer Phase, in der wir den zu einer bestimmten Teilchen-Konzentration gehörenden Fluß gemessen haben, wurden beide Lösungen entfernt und auf beide Seiten Lösungen einer anderen Teilchen-Konzentration gegeben (Anfangsvolumen wieder 5,7 ml), und die zuvor "heiße" Seite wiederum sofort mit einer etwa gleichgroßen Isotopen-Aktivität wie zuvor versehen. Die spezifische Aktivität der einzelnen Badlösungen war somit etwa umgekehrt proportional zur chemischen Konzentration des betreffenden Teilchens. Von den am Ende jeder Phase entnommenen Lösungen bestimmten wir die chemische Konzentration von PAH und Cl.

Die hohe zeitliche Auflösung der beschriebenen Methode erlaubte es, festzustellen, ob der Teilchen-Fluß während der Dauer einer Phase von ca. 50 min. stationär war oder nicht. In der Regel haben wir die Teilchen-Flüsse an einer Haut von niedrigen zu höheren Konzentrationen des betreffenden Teilchens gemessen und jeden Versuch mit der Kontrolle der ersten Phase beendet. Die Berechnung der Flüsse bzw. der Permeabilität aus den Aktivitätsmessungen, den Kammervolumina und der Hautfläche ist in E II angegeben.

Gelegentlich wurden simultan in zwei identischen Kammern die Flüsse ϕ_{15} und ϕ_{31} an einer symmetrisch geteilten Haut desselben Frosches ermittelt. Da nicht auszuschließen war, daß auch an den beiden Hauthälften eines Versuchstieres - aus welchen Gründen auch immer - unterschiedliche Voraussetzungen für die Flußmessung vorlagen (Ocv und SCC und L der beiden Hälften wichen oft sehr stark voneinander ab), haben wir auch Versuche durchgeführt, in denen wir zeitlich kurz hintereinander an derselben Hautfläche Flüsse in den

beiden Richtungen ermittelt haben. Zuerst wurde der Fluß ϕ_{13} und dann ϕ_{31} gemessen. Allerdings war eine anschließende Kontrolle (2. Messung von ϕ_{13}) in diesem Fall nicht sinnvoll, da sich in der vorangehenden Phase im großen Extrazellulärraum der Koriumseite eine beträchtliche Isotopenmenge angesammelt hatte, die erst ausgewaschen werden mußte, bis ein stationärer transepithelialer Fluß meßbar wäre.

Von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen (siehe Ergebnisse) wurde das Verhältnis der Aktivitäten auf beiden Seiten stets so gewählt, daß bei einer Flußmessung der Rückfluß von der kalten zur heißen Seite zu vernachlässigen war.

In einer anderen Versuchsserie wurde die Temperatur T der beiden Badlösungen, und somit die der Haut, in 2 - 3 definierten Schritten zwischen 5 und 30 °C variiert und dabei die Isotopenflüsse, wie oben beschrieben, gemessen. Nach Abschluß einer Phase wurde das entnommene Volumen auf beiden Seiten wieder ergänzt und T geändert. Stationarität des zu dieser Temperatur gehörenden Flusses stellte sich nach ca. 30 min. ein. Aus den Diagrammen, in denen $\log \phi$ gegen $1/T$ (Arrhenius Plot) aufgetragen wurde, haben wir die zu den einzelnen Flüssen gehörenden Aktivierungsenergien E_{ij} ermittelt.

Im Vergleich dazu haben wir E_{ij} für die PAH- und Cl-Diffusion in angenähert wässriger Phase an künstlichen Filter-Membranen aus regenerierter Zellulose (Fa. Sartorius, Typ SM 11536, Porendurchmesser 5 - 10 nm) gemessen; außerdem haben wir E_{ij} unter der vereinfachten Annahme berechnet, daß der Teilchenfluß folgendermaßen von der Temperatur abhängt: $\phi \sim T/\eta(T)$; $\eta(T)$ ist die Viskosität des Wassers, s. Netter (1959). (Berechnung der Aktivierungsenergie s. EIII).

B III 2 Simultane Messung zweier gleichgerichteter Tracer-Flüsse (z. B. ^{36}Cl - und ^3H -PAH-Influx bzw. -Efflux)

Die simultane Ermittlung zweier gleichgerichteter, verschiedenen markierter Teilchenflüsse setzt die Diskriminierung der

beiden Isotopenaktivitäten mit Hilfe eines Zweikanal-Szintillationszählers voraus; die Parameter "Window" und "Gain" werden so eingestellt, daß in dem einen Kanal möglichst viele Impulse des anderen Isotops erfaßt werden. Mißt man für eine solche Einstellung von jedem Isotop den Diskriminierungsfaktor zwischen beiden Kanälen, außerdem noch deren Nulleffekte, so kann man nach den in E IV angegebenen Formeln aus den Aktivitäten der beiden Kanäle die wahren Aktivitäten der beiden Isotope ermitteln. Die optimale Kanaleinstellung ergibt sich aus den Diagrammen der Abb. 7, die im Liquid Scintillation Counter (Fa. Packard) gemessen wurden. Von einer reinen

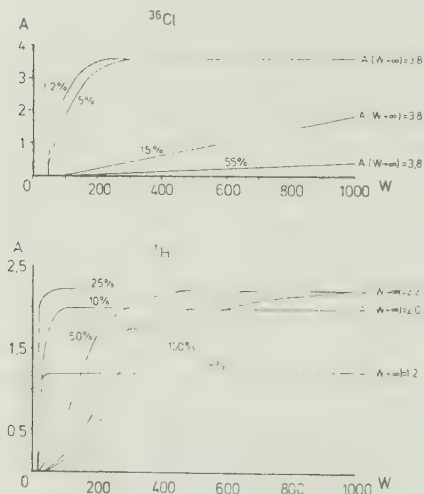


Abb. 7:

Beziehung zwischen Aktivität und Window bei festgesetzten Gainwerten für eine ^{36}Cl -Probe (oben) und eine ^3H -Probe (unten) zur Einstellung der optimalen Diskriminierung beider Isotope.

A = Activity

W = Window

^3H - bzw. ^{36}Cl -Probe unterschiedlicher Gesamtaktivität sind für verschiedene Gainwerte die Aktivitäten gegen die Größe des Window bei konstanter Schwelle (15) aufgetragen. (Das Window ist bis 1000 kontinuierlich variabel, dann ist nur noch der Wert ∞ einstellbar).

Der Vergleich der beiden Diagramme zeigt, daß für das niederenergetische Isotop ^3H bei kleinen Gainwerten schon innerhalb kleiner Windows eine konstante, d. h. von einer weiteren

Window-Vergrößerung unabhängige Aktivität gemessen wird. Bei Gain = 25 % ist diese Aktivität maximal und bei Window 75 erreicht. Beim höherenergetischen ^{36}Cl ist für den hohen Gainwert (55 %) bei Window 1000 erst ca. 10 % seiner maximalen Aktivität erreicht. Die restlichen 90 % liegen also in Window 1000 - ∞ .

Eine gute Diskriminierung der beiden Isotope ist also dann möglich, wenn ^3H im einen Kanal mit relativ kleinem Gain (25 %) und mit Window 15 - 75 und Cl im anderen Kanal bei hohem Gain (65 %) und mit Window 1000 - ∞ gemessen wird.

B III 3 Simultane Messung zweier entgegengerichteter Tracer-Flüsse (z. B. ^{22}Na -Influx und ^{24}Na -Efflux)

Bei der simultanen Messung zweier entgegengesetzter Tracer-Flüsse an einer Membran tritt das Problem auf, kleine Aktivitätsänderungen des einen Isotops in Anwesenheit der hohen Stammlösungsaktivität des anderen Isotops zu messen. Dieses Problem ist für die beiden Na-Isotope lösbar, weil ^{24}Na eine kleine Halbwertszeit von 15 hr hat und kleine ^{24}Na -Aktivitäten gegen große ^{22}Na -Aktivitäten aufgrund ihres verschiedenen Energiespektrums gut diskriminiert werden können. In

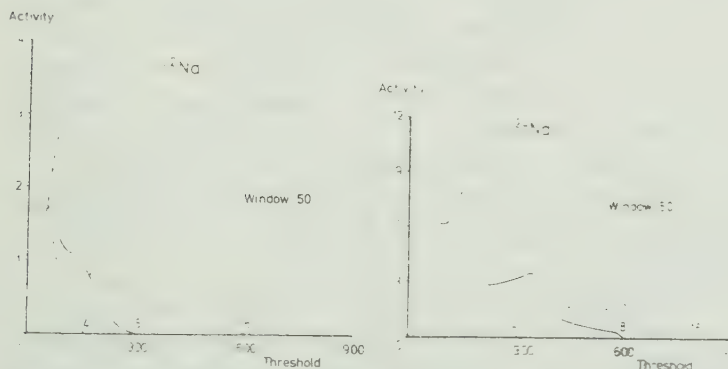


Abb. 8: Beziehung zwischen Aktivität und Schwelle bei festen Gainwerten für eine ^{22}Na - (links) und eine ^{24}Na -Probe (rechts) zur Einstellung der optimalen Diskriminierung beider Isotope.
Window = konst. = 50.

Abb. 8 sind die Spektren der beiden Na-Isotope in Abhängigkeit der drei Gainwerte 4, 8 und 16 % gezeichnet, wie sie am Tracerlab-Bohrloch-Kristall gemessen wurden. Im Unterschied zur Abb. 7 ist hier bei konstantem Window (50) die Schwelle (Threshold) variiert worden. Mit der Einstellung: z. B. Gain = 8 % und Window 350 - 1000 mißt man, bezogen auf die Gesamtaktivität des jeweiligen Isotops bei völlig offenem Fenster von ^{24}Na noch 10 % und von ^{22}Na nur 1 %. ^{22}Na wird also bei dieser Einstellung gegenüber ^{24}Na 100-fach unterdrückt. Je nach Größe der Aktivitäten von ^{22}Na und ^{24}Na kann die untere Schwelle für jede gewünschte andere Diskriminierung der beiden Isotope geändert werden.

Zur Messung der beiden unidirektionalen Na-Flüsse haben wir ca. 20 μCi ^{22}Na auf die Epithel- und ca. 1 - 2 mCi ^{24}Na auf die Koriumseite pipettiert. Da wir in diesen Versuchen in der einen Meßphase 10 - 12 Doppelsamples von je 50 μl in 10minütigen Abständen entnommen haben, wählten wir ein etwas größeres Ausgangsvolumen als in B III 1 angegeben, nämlich 8 ml.

Die Samples der Epithelseite wurden sofort gezählt; da die ^{22}Na -Aktivität (durch eine gute Diskriminierung beider Isotope) effektiv unterdrückt wurde, entsprachen die gemessenen Zählraten der einzelnen Samples der ^{24}Na -Aktivität; diese werden alle auf den Zeitpunkt t_0 des Zählbeginns mit Hilfe der Halbwertszeit des ^{24}Na -Zerfalls umgerechnet. Bei gleicher Diskriminierungseinstellung wurden die Samples der Koriumseite, allerdings erst nach 2 - 3 Tagen, gemessen (und ebenfalls auf den Zeitpunkt t_0 umgerechnet), da die Zählraten von Proben sehr hoher Aktivität eine beträchtliche zeitliche Drift zeigten, die erst bei Aktivitäten von 30×10^5 cpm verschwindet.

Nach einigen Wochen, wenn die gesamte ^{24}Na -Aktivität abgeklungen war, erfolgte in einer zweiten Messung derselben Proben die Bestimmung der ^{22}Na -Aktivitäten, nun aber bei völlig offenem Fenster.

Im Gegensatz zu B III 1 und 2 wurde der Teilchenfluß nicht aus dem mittleren Aktivitätsverlauf mehrerer entnommener Samples berechnet, sondern mehrere Einzelflüsse aus den Aktivitäten von zwei nacheinander entnommenen Samples, um diese Flüsse mit dem zum gleichen Zeitpunkt gemessenen, momentanen SCC vergleichen zu können.

Die ^{24}Na -Proben enthielten neben anderen kurzlebigen Isotopen (z. B. ^{38}Cl , ^{23}Ne , ^{20}Fl) auch ^{36}Cl . Deshalb war es nicht möglich, neben den beiden unidirektionalen Na-Flüssen noch den Cl-Influx zu ermitteln.

B III 4 Flußbestimmung nach der Methode der direkten Photometrie (z. B. unidirektionale PAH-Flüsse)

Die Methode der direkten Photometrie besteht darin, daß der Fluß eines Teilchens (in unserem Fall PAH), das im UV- oder im sichtbaren Bereich absorbiert, kontinuierlich und synchron zum Versuchsablauf ermittelt wird, und zwar aus dem zeitlichen Verlauf der optischen Transmission der Kammerflüssigkeit, in die hinein der Teilchenfluß erfolgt. Das Prinzip der Meßanordnung ist bereits in B I erläutert worden. Die Wellenlänge des verwendeten Lichts entspricht der der ersten Absorptionsbande von PAH bei 275 nm, siehe Abb. 9; zusätzlich ist das Spektrum von Diodrast eingezeichnet.

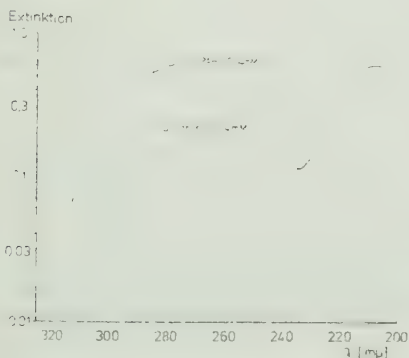


Abb. 9:
Extinktionsspektrum von
PAH und Diodrast

Im Unterschied zu allen bisher besprochenen Flußmessungen liegt bei dieser Methode ein chemischer Konzentrationsgradient vor: auf der einen Seite befindet sich die PAH-haltige Lösung mit bestimmter, aber variabler Konzentration, auf der anderen Seite, auf der sich die Durchflußküvette befindet, wird für jede Phase - oder manchmal auch innerhalb einer Phase - eine neue PAH-freie Lösung eingefüllt. Zu Beginn jeder Phase wird die Hochspannung des Photomultipliers und/oder der Austrittsspalt des Monochromators so justiert, daß am Arbeitswiderstand des Photomultipliers exakt 1000 mV liegen; diese Spannung wird auf 0 mV kompensiert und so können am Schreiber oder Millivoltmeter kleinste Intensitätsänderungen erfaßt werden. Die zeitliche Drift des Systems Deuterium - Lampe - Photomultiplier - Schreiber beträgt innerhalb von Stunden bezogen auf 1000 mV etwa 1 %. Im Betrieb, d. h. wenn sich die Küvette im Strahlengang befindet und die Zirkulation der Kammerlösung durch eingeleitetes O_2 erfolgt, überlagert sich dem Signal ein Rauschen, welches - bezogen auf die gleiche Spannung - ca. 5 % ausmacht.

Nach dem Einbringen der PAH-haltigen Lösung auf die eine Seite der Kammer kann man auf der anderen Seite die Einlauf- und die stationäre Phase des PAH-Flusses beobachten. Aus der momentanen Intensität I , der Änderung $\Delta I/\Delta t$ und einigen anderen Parametern wird dann nach einer in E V angegebenen Formel der PAH-Fluß berechnet.

Bei dieser Methode ist zu berücksichtigen, daß die Froschhaut sowohl auf der Epithel- wie auf der Koriumseite Substanzen in die Kammerlösungen entläßt, deren Absorption im Bereich λ 300 nm liegt und deren Anwesenheit die eigentliche PAH-Messung erschwert. Die Auswaschrates dieser Substanzen ist auf der Koriumseite deutlich größer als auf der Epithelseite; auf beiden Seiten stellt sich jedoch nach 30 - 90 Minuten Einlaufzeit eine konstante Auswaschrates ein, die bei der Berechnung des PAH-Flusses berücksichtigt werden muß.

Wir haben die Spektren dieser Auswaschsubstanzen von Lösungen gemessen, die wir mehrere Male hintereinander, nach etwa gleich langen Kontaktzeiten mit der Haut, der Kammer entnommen haben. Die zeitliche Änderung der so erhaltenen Spektren läßt erkennen, daß es sich bei den Lösungen um ein Substanzgemisch handelt, deren einzelne Komponenten jedoch nicht analysiert wurden.

Untersucht man nach dieser Methode an der Froshhaut Flüsse organischer Substanzen, so entfällt die Berücksichtigung dieses Auswascheffektes, wenn deren Extinktionsspektrum Absorptionsbanden im Bereich >300 nm zeigt; das ist für alle Farbstoffe der Fall, auch zum Beispiel für Amilorid (360 nm), Furosemid (330 nm), 3-Amino-Benzoesäure (300 nm), usw.

B IV Messung der Zellinnenkonzentration von austauschbarem Cl ($[Cl]_{ICV}^*$)

Etwa flächengleiche Hautstückchen werden in inulinhaltigen Lösungen verschiedener Cl-Konzentrationen, aber etwa gleicher Cl-Aktivität ca. 90 min. lang inkubiert, in dieser Zeit in regelmäßigen Abständen kräftig geschüttelt und schließlich nach der Methode von Nagel und Dörge (1970) die Größe von $[Cl]_{ICV}^*$ der einzelnen Stückchen bestimmt.

Beim Auflösen der Haut in HNO_3 konnte bereits am Geruch eine Entwicklung von Cl_2 -Gas bemerkt werden: um diese möglichst klein zu halten, erfolgte die Auflösung bei Zimmertemperatur. Trotzdem ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch den Verlust an markiertem Cl nicht auszuschließen. Da sich in den Lösungen unterschiedlicher Cl-Konzentration immer gleiche Mengen an markiertem Cl befinden, dürfte der Fehler hauptsächlich bei den Werten kleiner Inkubationskonzentrationen in Erscheinung treten.

Die gelbe Farbe der in HNO_3 aufgelösten Hautstückchen, die von Probe zu Probe in ihrer Intensität sehr stark schwanken

konnte, hatte für die β -Messung einen im gleichen Maße variablen Quencheffekt zur Folge. Die Bestimmung des Quenchfaktors zur Korrektur der gemessenen Aktivitäten führten wir nach der Methode des externen Standards durch.

In einer weiteren Serie von Versuchen erfolgte vor der Bestimmung der austauschbaren Zellinnenkonzentration eine Messung des Cl-Flusses; dies erfolgte nach der üblichen, in B III 1 angegebenen Methode, nur besaßen die epithel- und koriumseitigen Lösungen eine identische Inulinkonzentration. Nachdem eine genügende Zahl von Proben entnommen war, wurden die epithel- und koriumseitigen Lösungen der Kammer entnommen, miteinander durchgemischt und die immer noch eingespannte Haut mit dieser Mischlösung 90 Minuten lang unter Kurzschlußbedingungen inkubiert; danach erfolgte die Bestimmung der Zellinnenkonzentration.

B V Untersuchungen in Na-freien Lösungen

In dieser Versuchsserie, in der sich das Epithel bis auf die kurzen Momente der SCC-Messung unter open circuit Bedingungen befand, haben wir mit Hilfe der Lösungen 2/0 und 90/0 (s. Tab. Ia) die Abhängigkeit der Werte für OCV und SCC von der Cl-Konzentration in Na-freien Lösungen gemessen. Beide Seiten des Epithels wurden mit einer der beiden Lösungen solange gespült, bis sich stationäre Werte für OCV und SCC eingestellt hatten; der zeitliche OCV-Verlauf wurde mit einem Schreiber registriert, der SCC durch kurzzeitiges Kurzschließen ermittelt.

Wie aus der Tab. Ia hervorgeht, sind die Lösungen 2/0 und 90/0 nicht absolut Na-frei. Da die zu erwartenden Werte von OCV und SCC in diesen Lösungen relativ klein sind, konnte diese Na-Konzentration Größe und Richtung dieser elektrischen Parameter entscheidend beeinflussen, ebenso wie das Na, das im Verlauf einer Phase aus der Haut ausgewaschen wurde. Deshalb ermittelten wir, parallel zur Messung von

OCV und SCC, zur Kontrolle flammenphotometrisch die Na-Konzentrationen. Außerdem mußte wegen der Kleinheit der Werte von OCV und SCC besonderer Wert auf die Kenntnis der momentanen Elektrodenasymmetriepotentiale gelegt werden. Nach jedem Lösungswechsel wurden daher die Elektroden in der entnommenen und - bei Wahl einer Lösung anderer Zusammensetzung - auch in dieser kurzgeschlossen und die jeweils gemessenen Spannungen auf dieses Potential bezogen.

Um einen Anhalt dafür zu haben, welchen positiven SCC die in Lösung befindliche Na-Konzentration verursacht haben könnte, wurde nach erfolgter Na-Konzentrationserhöhung um 0.1 meq/l auf Epithel- und Koriumseite die Änderung von OCV und SCC gemessen.

C Ergebnisse

C I Untersuchungen des PAH-Transportes

C I 1 Konzentrationsabhängigkeit der unidirektionalen PAH-Flüsse

Da wir die Konzentrationsabhängigkeit des PAH-Transportes in Lösungen messen wollten, die sich in ihrer Cl- und Na-Konzentration, außerdem ihrem pH-Wert und ihrer Osmolarität nicht voneinander unterscheiden, konnte die PAH-Konzentration nur zwischen 0 und 20 meq/l variiert werden (s. Tab. Ib).

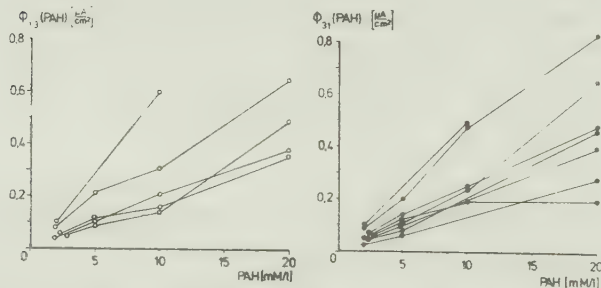


Abb. 10: Beziehung zwischen unidirektionalem transepithelialem PAH-Influx (links) bzw. -Efflux (rechts) und PAH-Konzentration. Die miteinander verbundenen Punkte sind Messungen, die an einer Haut gewonnen wurden.

In Abb. 10 sind einige exemplarische Beziehungen zwischen PAH-Fluß und PAH-Konzentration ($\emptyset$ -PAH-Diagramm) gezeigt. Die eingezeichneten Flüsse wurden ausschließlich aus Tracerflüssen berechnet. Im rechten Teil handelt es sich um unidirektionale PAH-Effluxe, im linken um unidirektionale PAH-Influxe. Auf der Suche nach Parametern, welche für die Streuung der Flüsse bei einer bestimmten Konzentration verantwortlich sein könnten, fanden wir, daß dafür weder die Größe der Leerlaufspannung und die des Kurzschlußstroms, noch die Leitfähigkeit der Haut in Frage kommen.

In den beiden Diagrammen der Abb. 11 sind alle gemessenen Flüsse berücksichtigt und deren Mittelwerte einschließlich ihrer Standardabweichungen in Abhängigkeit von der PAH-Konzentration dargestellt worden.

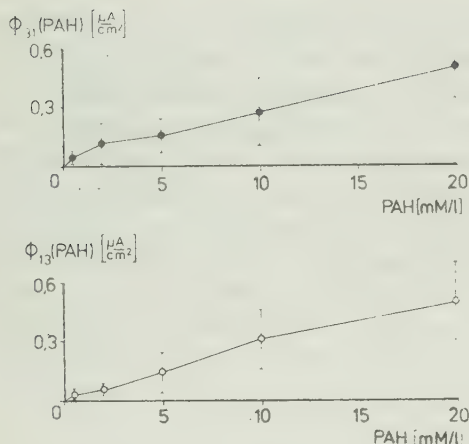


Abb. 11:

Zusammenfassung der Messungen aller unidirektionalen PAH-Flüsse

Oben: Mittelwerte und Standardabweichungen der Effluxe

Unten: Mittelwerte und Standardabweichungen der Influxe

In Tabelle III sind die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit der PAH-Flüsse zusammengefaßt. Aus der 8. und 9. Spalte geht hervor, daß nur der Netto-PAH-Efflux bei 0.5 meq/l signifikant von Null verschieden ist.

Die PAH-Permeabilität für die beiden unidirektionalen Flüsse errechnet sich aus Φ -PAH-Diagrammen zu etwa 5×10^{-7} cm/sec.

Die Ergebnisse der simultanen Messungen von PAH- und Cl-Flüssen werden in C II 1 f besprochen.

n	PAH meq/l	$\Phi_{13}(PAH)$ $\mu A/cm^2$	n	PAH meq/l	$\Phi_{31}(PAH)$ $\mu A/cm^2$	PAH meq/l	$\Phi_{13}^N(PAH)$ $\mu A/cm^2$	p
31	0.5	0.021 ± 0.013	12	0.5	0.038 ± 0.019	0.5	-0.017 ± 0.023	> 0.999
6	2.0	0.058 ± 0.027	5	2.0	0.115 ± 0.110	2.0	-0.057 ± 0.113	< 0.9
24	5.0	0.142 ± 0.100	6	5.0	0.154 ± 0.080	5.0	-0.012 ± 0.128	< 0.9
7	10.0	0.316 ± 0.160	6	10.0	0.273 ± 0.170	10.0	$+0.043 \pm 0.24$	< 0.9
18	20.0	0.498 ± 0.210	7	20.0	0.510 ± 0.162	20.0	-0.012 ± 0.27	< 0.9

Tabelle III: Zusammenfassung der PAH-Flußmessungen

p = Wahrscheinlichkeit der signifikanten Abweichung des Netto-Flusses $\Phi_{13}^N(PAH)$ von Null.

2.1.2 Temperaturabhängigkeit der PAH-Flüsse

In Abb. 12 ist aus dem Arrhenius-Plot die Aktivierungsenergie E eines Teilchenflusses zu 2.1 kcal/Mol berechnet worden, wobei angenommen wurde, daß seine Temperaturabhängigkeit proportional zur absoluten Temperatur und umgekehrt zur Viskosität η von Wasser ist. Die Werte für die Temperaturabhängigkeit von η wurden einer Tabelle von Brdicka (1965) entnommen. (Berechnung von E , s. E III).

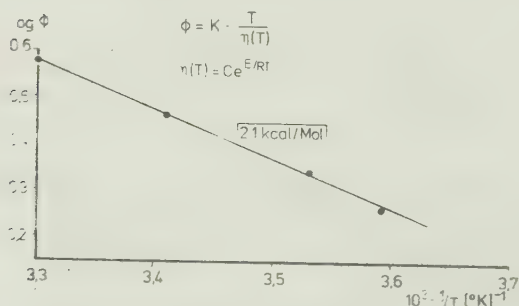


Abb. 12: Berechnung der Aktivierungsenergie für Teilchendiffusion in wässriger Phase unter der (vereinfachten) Annahme, daß der Diffusionsfluß proportional zur absoluten Temperatur und umgekehrt proportional zur Viskosität des Wassers ist. (Berechnung der Energie s. E III).

Im Vergleich dazu ergibt sich die Aktivierungsenergie für den PAH-Fluß durch die Sartorius Membran, d. h. durch eine praktisch rein wässrige Phase, zu 2.6 ± 0.1 kcal/Mol. Sie ist signifikant von dem oben angegebenen theoretischen Wert verschieden. (Berechnung s. E III).

Bei der Messung der Temperaturabhängigkeit von PAH-Flüssen an der Froschhaut ergibt sich bei der Auftragung $\log \Phi$ gegen $1/T$ eine lineare Beziehung, was Voraussetzung für die Berechnung einer definierten, für den gewählten Temperaturbereich gültigen Aktivierungsenergie ist. Wir haben die Aktivierungs-

energien an der Froschhaut für den PAH-Efflux bei einer chemischen PAH-Konzentration von 20 meq/l ermittelt, und zwar in 8 Experimenten nach der Isotopenmethode und in 7 Experimenten nach der Methode der direkten Photometrie; bei den Versuchen der letzteren Art liegt notwendigerweise ein chemischer Gradient vor: wir wählten speziell 20 meq/l PAH auf der Korium- und ≈ 0 meq/l auf der Epithelseite. In der Tab. IV sind die Ergebnisse zusammengefaßt: daraus ergibt sich nach der Isotopenmethode eine mittlere Aktivierungsenergie von 4.15 kcal/Mol, nach der Methode der direkten Photometrie ein Wert von 3.9 kcal/Mol. Beide Werte sind unsignifikant voneinander verschieden.

Exp.	Isotopenmethode E_{31} kcal/Mol	Meth. d.dir.Fotometrie E_{31} kcal/Mol
1	3.2	4.28
2	4.8	2.85
3	4.95	5.2
4	5.5	3.0
5	3.5	3.1
6	4.3	3.4
7	2.8	4.12
8	---	5.3
Mean	4.15 $\pm$ 1.0	3.9 $\pm$ 0.97

Tabelle IV: Aktivierungsenergien des unidirektionalen PAH-Effluxes bei 20 mM/l PAH.

C I 3 Potentialabhängigkeit der PAH-Flüsse

Die PD-Abhängigkeit der PAH-Effluxes wurde ausschließlich nach der Methode der direkten Photometrie, bei einer PAH-Konzentra-

tion von 20 meq/l, ermittelt; die angelegte transepitheliale PD, die stets nur in Richtung der spontanen OCV orientiert war, hielten wir während einer Versuchsphase auf einem konstanten Wert und beobachteten dann eine gewisse Zeit die sich einstellende Stationarität des Flusses, bevor eine andere Spannung gewählt wurde.

In Abb. 13 sind zwei typische PD-Abhängigkeiten von $\phi_{31}(20)$ und Gesamtleitfähigkeit L gezeigt: auf der Abszisse sind L ($\approx$ SCC/PD) und das Verhältnis des PAH-Flusses bei angelegter PD zu dem Fluß, der bei Kurzschluß der Haut gemessen wurde, aufgetragen. Im Beispiel links ist L bis mindestens 80 mV

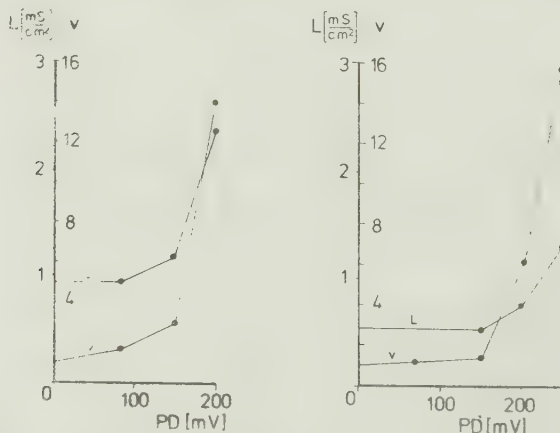


Abb. 13: Zwei Beispiele für die Abhängigkeit des PAH-Flusses $\phi_{31}(20)$ und der Leitfähigkeit von der Potentialdifferenz PD.

$$v = \frac{\phi_{31}(20)_{PD}}{\phi_{31}(20)_{PD=0}}$$

konstant; bei Übergang von 0 zu 100 mV beträgt die Zunahme des PAH-Flusses ca. 80 % (extrapolierter Wert). Ab 80 mV erfolgt eine sprunghafte Vergrößerung von L und $\phi_{31}(20)$. Im Beispiel rechts liegt diese Grenze bei einer etwa doppelt so großen Spannung (150 mV). Bei 100 mV erhält man für den PAH-

Fluß eine Vergrößerung von nur 15 % bezogen auf den Wert bei 0 mV. In anderen Experimenten wurde gefunden, daß auch bei Spannungen bis zu 150 mV weder der PAH-Fluß noch die Größe L eine meßbare Vergrößerung zeigten.

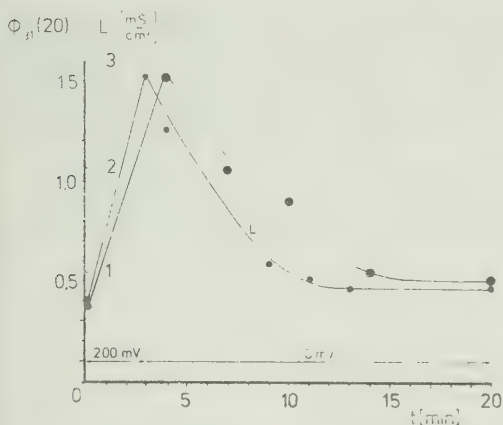


Abb. 14: Abhängigkeit des PAH-Flusses $\phi_{31}(20)$ und der Leitfähigkeit von der Zeit, nachdem während der Dauer von 3 min. eine trans-epitheliale PD = 200 mV angelegt worden war.

In Abb. 14 wird der zeitliche Verlauf von L und -in willkürlichen Einheiten- von $\phi_{31}(20)$ dargestellt, den wir erhielten, als wir an einer Froschhaut für 3 Minuten eine Spannung von 200 mV anlegten und für den Rest der Zeit ihre spontane Spannung auf 0 mV kompensierten. Die Größe L erfährt während der "200 mV-Phase" eine Vergrößerung um etwa den Faktor 4: in der "0 mV-Phase" findet in etwa 10 Minuten eine vollständige Regenerierung von L statt. Mit einer Phasenverzögerung von 1 Minute erreicht auch der PAH-Fluß, allerdings erst in der 0 mV-Phase, einen Maximalwert ($\phi_{31}(20)_{PD=0} / \phi_{31}(20)_{PD=200} \approx 1.5$). Anschließend nehmen $\phi_{31}(20)$ und L nach etwa 15 Minuten ihren Kontrollwert wieder an.

C II Untersuchungen des Cl-Transportes

C II 1 Messungen in Na-haltigen Lösungen (Na = 105 meq/l)

C II 1 a Konzentrationsabhängigkeit der unidirektionalen Cl-Flüsse

In Abb. 15 werden einige exemplarische ϕ -Cl-Diagramme gezeigt, von denen jedes einzelne an einer Haut gemessen wurde; im oberen Teil handelt es sich um unidirektionale Cl-Effluxe (ϕ_{31} (Cl/105)), im unteren um unidirektionale Cl-Influxe (ϕ_{13} (Cl/105)). Beide Flüsse zeigen im ganzen Cl-Konzentrationsbereich sowohl lineare wie nichtlineare Abhängigkeiten. Im Mittel scheinen die Cl-Influxe über den ganzen Konzentrationsbereich größer zu sein als die Effluxe.

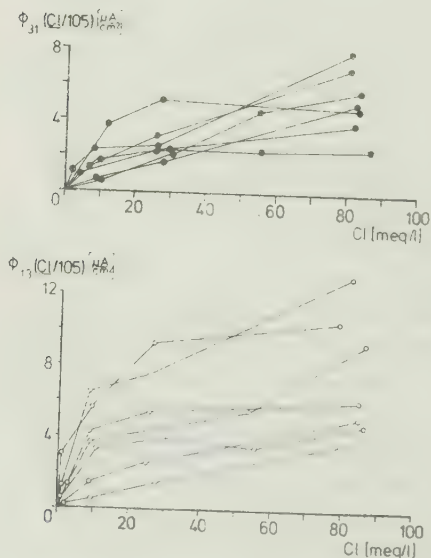


Abb. 15:

Beziehung zwischen unidirektionalem Cl-Efflux (Oben) und Cl-Influx (Unten) von der Cl-Konzentration anhand einiger Beispiele. Die miteinander verbundenen Punkte sind Messungen, die jeweils an einer Haut gewonnen wurden.

wir nehmen an, daß im Bereich niedriger Konzentrationen für alle Cl-Flüsse bis wenigstens 2.5 meq/l sowohl für ϕ_{13} als auch für ϕ_{31} ein linearer Zusammenhang zwischen ϕ und Cl besteht. Wir können also alle in diesem Konzentrationsbereich ermittelten Flüsse auf die Konzentration 0.5 meq/l umrechnen: ϕ (0.5/105).

Umgekehrt ist bei großen Cl-Konzentrationen (80 - 35 meq/l) der Cl-Fluß im allgemeinen von der Cl-Konzentration relativ wenig abhängig. Wir bezeichnen deshalb die in diesem Bereich gemessenen Flüsse mit Φ (83/105). (Die Tatsache, daß die höchsten gemessenen Cl-Konzentrationen im Mittel nur 83 meq/l betrugen, obwohl die Lösung 90/105 in die Kammer eingefüllt wurde, ist darauf zurückzuführen, daß diese durch den in der Kammer verbliebenen Rest einer weniger konzentrierten Lösung der vorangehenden Phase verdünnt wurde.)

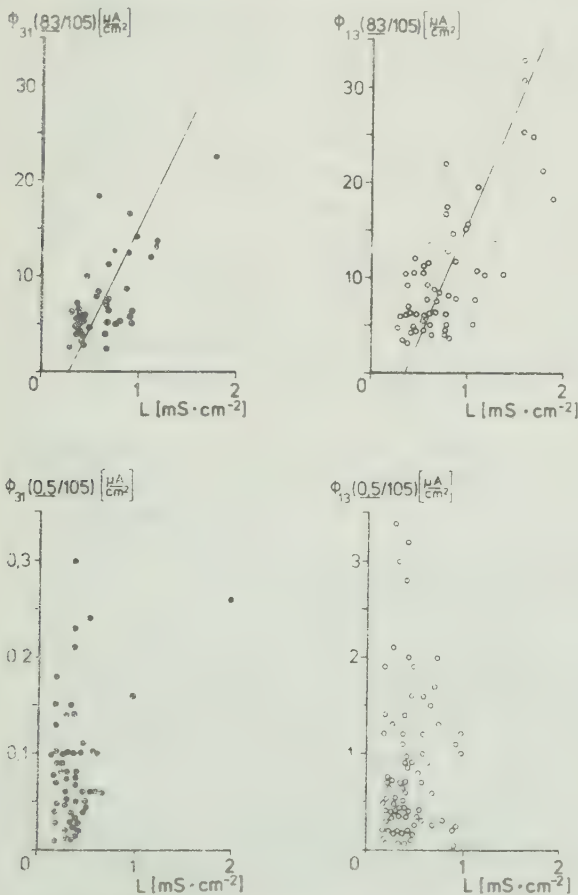


Abb. 16: Beziehung zwischen der Leitfähigkeit und den 4 unidirektionalen Cl-Flüssen; Korrelationskoeffizienten der eingezeichneten Regressionsgeraden: $r = 0.71$.

Auf der Suche nach Parametern, welche die große Streuung der Flüsse bei einer bestimmten Cl-Konzentration bedingen könnten, fanden wir, daß dafür weder die Größe des Kurzschlußstromes (SCC) noch die der Leerlaufspannung (OCV), sondern -wenigstens zum Teil- die Leitfähigkeit L (= SCC/OCV) verantwortlich gemacht werden können. Aus Abb. 16 geht dieser Befund hervor: es besteht eine deutliche Korrelation zwischen ϕ_{13} ($\frac{83}{105}$) bzw. ϕ_{31} ($\frac{83}{105}$) und der Größe L; ϕ_{13} ($\frac{0.5}{105}$) und ϕ_{31} ($\frac{0.5}{105}$) scheinen von L unabhängig zu sein. In zahlreichen Versuchen konnte festgestellt werden, daß nach einer anfangs stationären Phase von 30 - 50 min. besonders ϕ_{13} ($\frac{0.5}{105}$) kontinuierlich abnahm, obwohl OCV, SCC, L konstant blieben. Der Wert ϕ_{13} ($\frac{0.5}{105}$) war deshalb am Ende eines aus mehreren Phasen bestehenden Versuches in den meisten Fällen kleiner als zu Beginn dieses Versuches. Aus diesem Grund wählten wir als Größe dieses Flusses das arithmetische Mittel von Anfangs- und Endwert.

Wegen der aufgezeigten Beziehung zwischen ϕ_{13} ($\frac{83}{105}$), ϕ_{31} ($\frac{83}{105}$) bzw. ϕ_{13} ($\frac{0.5}{105}$), ϕ_{31} ($\frac{0.5}{105}$) einerseits und der Leitfähigkeit andererseits war eine konsequente Auswahl von Flüssen zur Einordnung in ein gemeinsames ϕ -Cl-Diagramm nur bei höheren Cl-Konzentrationen sinnvoll. Da wir einerseits die meisten Cl-Flüsse bei Cl = 83 meq/l in einem Leitfähigkeitsbereich $0.3 \leq L \leq 0.7$ mS/cm² gemessen haben, und andererseits kein Kriterium hatten, nach dem wir die Flüsse bei allen anderen Konzentrationen hätten auswählen können, wurden alle Flüsse, die in diesem Leitfähigkeitsbereich gemessen wurden, in das ϕ -Cl-Diagramm der Abb. 17 (Oben) aufgenommen. Trotz dieser Beschränkung ergeben sich für beide Flüsse bei einer bestimmten Konzentration immer noch erhebliche Streuungen. Diese lagen für Messungen an einer geteilten Haut etwa in der gleichen Größenordnung, wie die, welche an verschiedenen Häuten gewonnen wurden. Es können zwei Bereiche voneinander abgegrenzt werden: ein unterer, in dem Flüsse beider Richtungen liegen und ein oberer, der praktisch ausschließlich die Flüsse ϕ_{13} enthält.

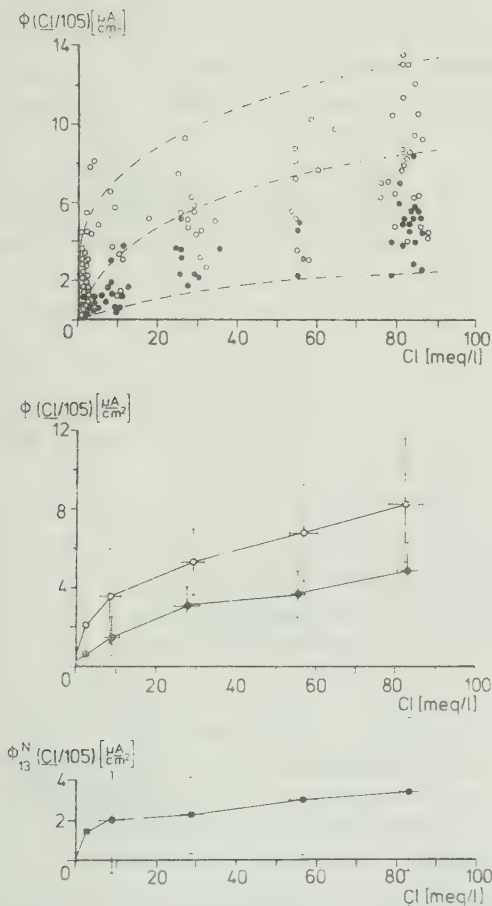


Abb. 17: Zusammenfassung der Messungen aller im Bereich $0.34 \leq L \leq 0.7 \text{ mS/cm}^2$ gemessener unidirektionaler Cl-Flüsse in Abhängigkeit von der Cl-Konzentration.

Oben: Einzelmessungen der Cl-Influxe (●) und Cl-Efflux (○);

Mitte: Mittelwerte und Standardabweichungen. (Relation zwischen 0 und 2.5 meq/l aus der Regressionsgeraden)

Unten: Mittelwerte und Standardabweichungen des Netto-Cl-Influsses

In Abb. 17 (Mitte) sind die Mittelwerte der Cl-Flüsse und in Abb. 17 (Unten) die Differenz dieser Mittelwerte gegen die Cl-Konzentrationen aufgetragen. Den Verlauf des ϕ -Cl-Diagramms zwischen 0 und 2,5 meq/l in Abb. 17 (Unten) erhielten wir aus der Regressionsgeraden, die aus allen Flußmessungen in diesem Konzentrationsbereich errechnet wurde.

n	Cl meq/l	$\phi_{13}(\text{Cl}/105)$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	n	Cl meq/l	$\phi_{31}(\text{Cl}/105)$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	Cl meq/l	$\phi_{13}^N(\text{Cl}/105)$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	p
8	2.5*	1.5*	46	2.5*	0.4**	2.5	1.1	
11	6.9 ± 2.4	3.6 ± 2.4	11	9.2 ± 1.5	1.6 ± 1.0	9.1 ± 2.56	2.0 ± 2.6	> 0.99
11	29.4 ± 2.6	5.3 ± 1.7	9	28.1 ± 3.3	3.1 ± 1.1	28.8 ± 4.2	2.2 ± 2.0	> 0.995
10	57.2 ± 3.5	6.9 ± 2.5	4	56.1 ± 0.7	3.7 ± 1.2	56.6 ± 3.0	3.2 ± 2.8	> 0.98
28	83.2 ± 3.4	8.3 ± 3.0	18	83.2 ± 2.3	4.9 ± 1.3	83.2 ± 4.1	3.4 ± 3.9	> 0.999

Tabelle V: Zusammenfassung der Cl-Flußmessungen.

+ Berechnung aus der Regressionsgeraden:
 $\phi_{13}(\text{Cl}/105) = 0.58 \times (\text{Cl}) + 0.6$

++ Berechnung aus der Regressionsgeraden:
 $\phi_{31}(\text{Cl}/105) = 0.14 \times (\text{Cl}) + 0.3$

p = Wahrscheinlichkeit der signifikanten
 Abweichung des Netto-Flusses $\phi_{13}^N(\text{Cl})$
 von Null

In Tab. V sind die in Abb. 17 (Unten) eingetragenen Werte mit Angabe von Standardabweichungen und Signifikanzen eingetragen, (die Standardabweichungen der Netto-Flüsse errechneten wir aus denen der beiden unidirektionalen Werte nach einer Formel, die von Sachs (1969) angegeben wurde).

Würde man statt der gefundenen meist nicht linearen Beziehung zwischen Cl-Efflux und Cl-Konzentration (Abb. 17 Mitte) eine lineare Korrelation annehmen, so entspräche dem Efflux von $4.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei 83 meq/l eine Cl-Permeabilität von ca. 60×10^{-7} cm/sec.

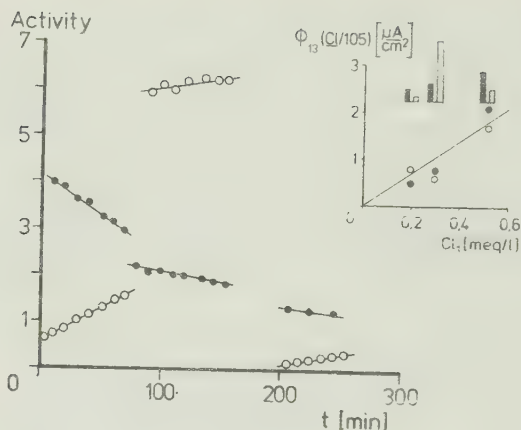
Aus Abb. 17 bzw. aus Tabelle V geht also hervor, daß im gesamten Konzentrationsbereich zwischen 0 und 90 meq/l ein Netto-Cl-Influx $\phi_{13}^N(\text{Cl}/105)$ existiert, dessen Abhängigkeit von der Kon-

zentration Ähnlichkeit mit einer Sättigungskinetik zeigt und bei ca. 83 meq/l einem Strom von $7,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ entspricht. Im Ursprung des ϕ -Cl-Diagramms ist das Verhältnis der Cl-Flüsse bei gleicher Cl-Konzentration, d. h. auch das der Cl-Permeabilitäten im Mittel nur etwa 4 : 1; dieser Wert ist aus oben genannten Gründen kleiner, als man es an ganz frisch präparierten Häuten erhält. Versuche, in denen wir die Flüsse ϕ_{17} (0.5/105) und ϕ_{31} (0.5/105) an der gleichen Haut zeitlich kurz hintereinander gemessen hatten, ergaben bisweilen ein Flußverhältnis von bis zu 50 : 1.

Normalerweise war das Verhältnis der Cl-Isotopenaktivität von "heißer" zu "kalter" Seite ca. 100 : 1; unter diesen Umständen war in der Regel der Rückfluß von aktivem Cl zu vernachlässigen; also entsprach die Aktivitätszunahme auf der ursprünglich kalten Seite mit großer Genauigkeit dem unidirektionalen Cl-Fluß.

In einer Reihe von Versuchen stellt sich dieses Verhältnis als zu klein heraus: bei kleinen Cl-Konzentrationen konnte, wie oben geschildert, das Verhältnis von ϕ_{17}/ϕ_{31} bis zu 50 : 1 sein; unter diesen Umständen müßte ein zu kleiner Fluß ϕ_{31} (0.5/105) gemessen werden, da nun der Rückfluß ins Gewicht fällt. Das wurde auch tatsächlich beobachtet: in einigen ϕ_{31} -Cl-Diagrammen lag der Fluß ϕ_{31} (0.5/105) deutlich unter dem Verlauf, der aus den übrigen Flüssen gewonnen wurde, für die der Rückfluß vernachlässigbar war.

In einer anderen Reihe von Versuchen haben wir das Verhältnis der Isotopenaktivität kleiner gemacht und bisweilen sogar < 1 gewählt; dies wird in Abb. 12 an Hand eines typischen Versuchs dieser Serie demonstriert. Das Diagramm zeigt den zeitlichen Aktivitätsverlauf auf der Epithel- und Koriumseite. Die Höhe der Cl-Aktivität auf beiden Seiten ist in allen drei Phasen so gewählt und der Cl-Influx so groß, daß ϕ_{17} (Cl/105) sowohl aus der Abnahme der Aktivität auf der Epithel- wie aus der Zunahme der Aktivität auf der Koriumseite bestimmt werden konnte. Das ϕ -Cl-Diagramm, das daraus gewonnen wurde, ist zusätzlich mit

Abb. 18: links unten:

Zeitlicher Aktivitätsverlauf auf der Epithel- (●) und Koriumseite (o) bei drei verschiedenen ^{36}Cl -Gradienten

rechts oben:

Daraus errechnetes Φ -Cl-Diagramm. Die Höhe der darüber eingezeichneten schwarzen bzw. weißen Säulen geben die in den drei Phasen vorliegenden mittleren ^{36}Cl -Konzentrationen auf der Epithel- bzw. Koriumseite wider. ●: Flüsse, die aus der Aktivitätsabnahme der Epithelseite, o: Flüsse, die aus der Aktivitätszunahme der Koriumseite berechnet werden.

angegeben: die schwarzen und weißen Säulen darüber geben die Konzentrationsverhältnisse auf der Epithel- bzw. Koriumseite der drei verschiedenen Phasen wider. Der Cl-Fluß, der in der zweiten Phase gemessen wurde und der ein Cl-Konzentrationsverhältnis von ca. 1 : 3 überwinden muß, liegt unter der eingezeichneten Geraden; dafür ist sicher der Cl-Rückfluß Φ_{13} verantwortlich.

Mißt man den Fluß Φ_{13} ($0.5/105$) zunächst auf die übliche Weise (auf beiden Seiten befinden sich identische Lösungen) und bietet anschließend auf der Koriumseite eine Lösung hoher Cl-Konzentration an, behält aber die Lösung auf der Epithelseite bei, so bleibt der Cl-Fluß zumindest konstant und wird nicht selten sogar größer.

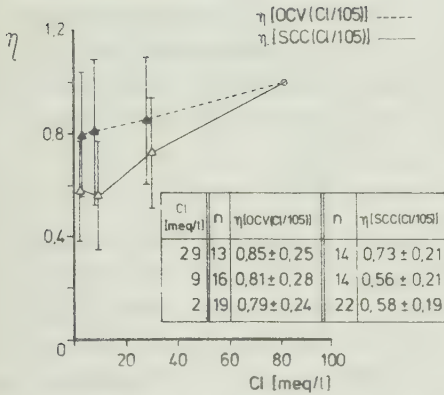


Abb. 19:

Abhängigkeit der transepithelialen Potentialdifferenz und des Kurzschlußstroms von der Cl-Konzentration.

$$\eta [OCV(Cl/105)] = \frac{OCV(Cl/105)}{OCV(83/105)}$$

$$\eta [SCC(SCC/105)] = \frac{SCC(Cl/105)}{SCC(83/105)}$$

Aus der Abb. 19 geht die Abhängigkeit der Größen OCV und SCC von der Cl-Konzentration hervor (die Werte von OCV, SCC und Cl) stammen von den gleichen Versuchen, mit denen auch die ϕ -Cl-Diagramme der Abb. 15, 17 erhalten wurden. Die in diesem Zusammenhang eingeführte Größe η gibt an, welcher Bruchteil von der OCV bzw. dem SCC, bezogen auf deren Größe bei Cl = 83 meq/l, übrigbleibt, wenn man zu niedrigen Cl-Konzentrationen übergeht: es zeigte sich, daß bei Cl = 2 meq/l die OCV um ca. 20 %, der SCC um ca. 40 % abgenommen haben.

C II 1 b Beziehungen zwischen Cl-Influx und SCC

Wir haben die Frage untersucht, ob die beobachtete Anisotropie der Froschhaut gegenüber Cl etwa als Folge einer Kopplung mit dem aktiven Na-Transport interpretiert werden könnte, der an diesem Epithel simultan und in gleicher Richtung erfolgt und dessen Transportkapazität um etwa eine Größenordnung höher ist als der soeben beschriebene Cl-Transport. Da unter Kurzschlußbedingungen eine solche Kopplung nur in einer Stimulierung des Cl-Influsses bestehen könnte, genügt es, sich bei der Beantwortung der Frage auf den Cl-Influx allein, und dabei speziell auf den bei niedrigen Cl-Konzentrationen zu beschränken. Für

jede Art von Kopplung zwischen Na- und Cl-Transport müßte näherungsweise gelten, daß der Isotopenfluß ϕ_{13}^* (Cl) proportional ist dem Kurzschlußstrom SCC und der spezifischen Aktivität $[Cl]^*/[Cl]$; die Proportionalitätskonstante ist der Kopplungsparameter k, der möglicherweise, neben anderen Größen, von SCC und der Cl-Konzentration abhängt:

$$\phi_{13}^* (Cl) = k (SCC, Cl) \times SCC \times \frac{[Cl]^*}{[Cl]}$$

Die Kopplung zwischen beiden Transporten könnte experimentell bedingt sein: infolge des endlichen Abstandes der Spannungsmeßelektroden vom Epithel (je ca. 0.5 mm) bleibt im Kurzschlußfall an den Epithelstrukturen, die den größten Prozentsatz des gesamten Widerstandes der Haut ausmachen, eine Restspannung bestehen, was zur Folge hat, daß die unter open circuit Bedingungen bestehende elektrische Kopplung zwischen Na^+ und Cl^- nicht vollkommen aufgehoben ist. Jedoch, eine Abschätzung dieser Spannung (<1 mV) und die fehlende oder unmeßbar kleine Abhängigkeit des Cl-Influges von der transepithelialen Spannung (Kristensen 1972) machen deutlich, daß diese Art von Kopplung für den gefundenen Netto-Cl-Fluß nicht verantwortlich gemacht werden kann.

Infolge der besonderen Anordnung unserer Stromelektroden ist das elektrische Feld in der Kammer nicht homogen. Die Folge davon könnte sein, daß die Äquipotentiallinien nicht in der Ebene des Epithels liegen und deshalb die im Kurzschlußfalle an einer Stelle eingestellte und gemessene OCV = 0 nicht repräsentativ für die ganze Haut sein muß. Das ist aber auszuschließen, da sich das Verhältnis der spezifischen Leitfähigkeit von Lösung zu Haut wie etwa 1000 : 1 verhalten; also ist die Haut wegen ihres relativ hohen Widerstandes notwendigerweise eine Äquipotentialfläche; außerdem befindet sich die Haut in der Symmetrieebene zwischen den beiden Elektroden, welche per se eine Fläche konstanten Potentials darstellt. Wäre obige Gleichung erfüllt, müßte der Fluß ϕ_{13}^* (Cl) und somit auch ϕ_{13} (Cl) bei konstanter chemischer Cl-Konzentration

eine Funktion des SCC sein; im Falle, daß die Kopplungskonstante nicht von SCC abhängt, bestünde diese Funktion in einer einfachen Proportionalität. Wie in C II 1 a erwähnt, wurde oft beobachtet, daß die Cl-Flüsse bei kleinen Cl-Konzentrationen in der Einlaufphase eines Versuchs zwar nach der üblichen Zeit zunächst einen stationären Wert erreichten, dann aber kontinuierlich abnahmen. In der Abb. 20 haben wir von solchen Versuchen

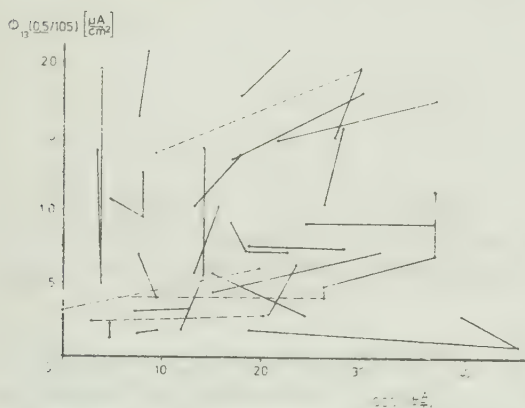


Abb. 20: "Beziehung" zwischen den Cl-Flüssen $\Phi_{13}(0.5/105)$ und dem Kurzschlußstrom; die jeweils miteinander verbundenen Punkte sind die Ergebnisse einer Phase. Die gestrichelten Linien entsprechen den Versuchen, in denen der SCC durch epithelseitige Gabe von 10^{-4} M/l Amilorid gehemmt wurde.

2 - 3 Werte von $\Phi_{13}(0.5/105)$ und SCC mehrerer solcher Phasen gegeneinander aufgetragen und mit durchgezogenen Linien miteinander verbunden. Die gestrichelten Linien sind aus Versuchen gewonnen, in denen der SCC durch Amiloridzugabe verkleinert oder völlig gehemmt wurde. Dieses Diagramm zeigt deutlich, daß von einer Korrelation zwischen Cl-Fluß und SCC nicht die Rede sein kann.

Die gleiche Aussage folgt aus der Abb. 21: hier wurden von den Versuchen, in denen die chemischen Cl-Konzentrationen so klein wie möglich waren (0.2 - 0.6 meq/l), einerseits die Flüsse

$\phi_{13}(0.5/105)$ und andererseits die gleichzeitig gemessenen Kurzschlußströme SCC gegen die Leitfähigkeit aufgetragen.

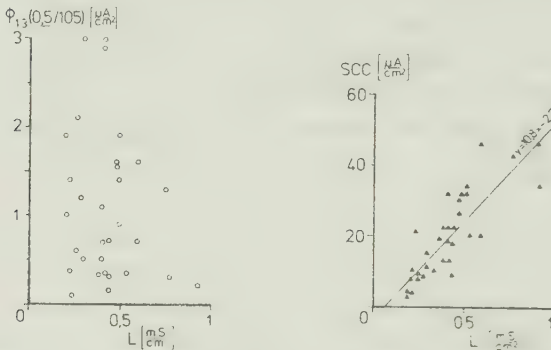


Abb. 21: Korrelationen zwischen $\phi_{13}(0.5/105)$ bzw. SCC (0.5/105) und der Leitfähigkeit L. Jeweils ein Punkt im linken und im rechten Diagramm wurde in einem Versuch ermittelt. Korrelationskoeffizient der SCC-Abhängigkeit $\rho = 0.83$.

Da zwar der SCC linear mit L verknüpft ist, die Flüsse $\phi_{13}(0.5/105)$ aber -wie schon aus Abb. 16 hervorging- in keiner Beziehung zu L stehen, folgt, daß keine Beziehung zwischen $\phi_{13}(0.5/105)$ und SCC besteht. Wir wählten deshalb die Versuche mit möglichst kleiner Cl-Konzentration aus, um auszuschließen, daß die Cl-Ionen selbst die Größe der Leitfähigkeit mitbestimmen, L also bis auf einen kleinen Bruchteil der Na-Leitfähigkeit $L = L(\text{Na})$ entspricht.

C II 1 c Beziehung zwischen Netto-Na-Transport und SCC

Nachdem wir auch bei Cl-Konzentrationen, die etwa denen normaler Ringerlösungen entsprechen, Netto-Cl-Flüsse gefunden haben, wollten wir untersuchen, ob sich ein, diesem Fluß äquivalenter (negativer) Kurzschlußstrom nachweisen läßt; aus diesem Anlaß haben wir die z. B. von Ussing (1951), Aceves und Eriij (1971) postulierte Identität von Kurzschlußstrom und Netto-Na-Fluß nochmals überprüft.

Exp	$\phi_{13}(83/\underline{105})$	$\phi_{31}(83/\underline{105})$	$\phi_{13}^N(83/\underline{105})$	SCC	$\phi_{13}^N\text{-SCC}$	n
	$\mu\text{A}/\text{cm}^2$					
1	36,12	5.57	30.55	25.51	+ 5.04	7
2	51.89	24.97	26.92	23.33	+ 3.59	11
3	31.55	5.00	26.00	23.73	+ 2.27	8
4	38.08	4.89	33.19	31.15	+ 2.04	9
5	30.31	13.46	16.85	15.56	+ 1.29	7
6	20.65	3.84	17.81	17.54	+ 0.27	7
7	37.14	7.75	29.39	33.16	- 3.77	8
8	39.24	30.14	9.10	15.10	- 6.00	11

Tabelle VI: Vergleich zwischen Netto-Na-Fluß und Kurzschlußstrom

Tabelle VI zeigt die Ergebnisse, die an 8 Häuten erhalten wurden. Die in der letzten Spalte angeführten Zahlen geben an, über wieviel einzelne Sample-Aktivitäten und Strommessungen die in der zugehörigen Zeile stehenden Größen gemittelt wurden. Der Spalte 6 ist zu entnehmen, daß die Richtigkeit der untersuchten Identität auf Grund der angegebenen Werte nicht in Frage gestellt aber auch nicht bestätigt werden kann, da die Streuungen der Werte in der gleichen Größenordnung liegen wie der eventuell auftretende Effekt. Um die Gültigkeit dieser Identität genauer zu überprüfen, müßten diese Versuche mit höchster Präzision durchgeführt werden, wobei neben den beiden unidirektionalen Na-Flüssen zusätzlich mindestens noch der Cl-Fluß $\phi_{13}(83/105)$ gemessen werden sollte. Von den 8 Versuchen, deren Ergebnisse in Tab. VI zusammengefaßt wurden, haben wir in Abb. 22 die Na-Flüsse $\phi_{31}(83/105)$ gegen L aufzutragen: davon stammen 7 Punkte (ausgefüllte Kreise) von den Versuchen, in deren Verlauf L konstant blieben. In einem Versuch schwankte L etwa zwischen 1

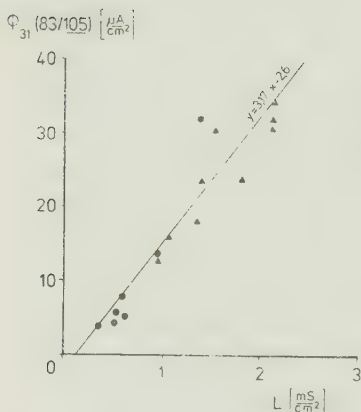


Abb. 22:

Korrelation zwischen Na-Efflux $\Phi_{31}(83/105)$ und Leitfähigkeit L .
Korrelationskoeffizient $r = 0.93$.

und 2 mS/cm^2 ; die zu einem bestimmten L errechneten Na-Flüsse wurden ebenfalls in das Diagramm aufgenommen (ausgefüllte Dreiecke). Wie man sieht, ergibt sich eine ziemlich gut definierte lineare Korrelation zwischen beiden Größen.

C II 1 d Aktivierungsenergien der Flüsse $\Phi_{13}(0.5/105)$, $\Phi_{13}(83/105)$ und $\Phi_{31}(83/105)$

Bei der Messung der Temperaturabhängigkeit von Cl-Flüssen an der Froschhaut ergibt sich bei der Auftragung $\log \Phi$ gegen $1/T$ eine lineare Beziehung, aus der sich eine definierte Aktivierungsenergie berechnen läßt, s. E III.

Die Ergebnisse der Versuche, in denen wir die Aktivierungsenergien E_{ij} von drei unidirektionalen Cl-Flüssen Φ_{ij} gemessen haben, sind in der Tabelle VII zusammengefaßt. Aus ihr geht hervor, daß die Werte von $E_{13}(0.5/105)$ im Bereich zwischen 3 und 7 kcal/Mol schwanken; ihr Mittelwert liegt bei 5.4 kcal/Mol; die gefundene, relativ große Streuung der Energiewerte ist wahrscheinlich nicht zufällig; es scheint vielmehr, daß im Mittel um so größere Energien gefunden wurden, je größer die zugehörigen Flüsse waren. Die Mittelwerte von

Exp	ϕ_{13} (95/105) $\mu A/cm^2$	E_{13} (95/105) kcal/Mol	ϕ_{13} (83/105) $\mu A/cm^2$	E_{13} (83/105) kcal/Mol	ϕ_{31} (83/105) $\mu A/cm^2$	E_{31} (83/105) kcal/Mol
1	2.5	5.6	24.0	2.8	21.0	2.3
2	1.6	7.1	22.0	3.7	21.0	3.0
3	1.2	6.1	18.0	3.2	18.0	3.9
4	0.5	6.7	12.0	5.2	13.0	2.9
5	0.4	5.5	9.8	4.9	9.5	3.9
6	0.37	6.1	7.9	4.1	8.3	4.0
7	0.21	5.3	7.8	2.3	7.8	3.4
8	0.19	7.1	7.7	3.0	6.3	2.1
9	0.19	5.1	6.5	4.3	4.8	2.5
10	0.19	4.7	6.4	3.4		
11	0.09	5.0	6.3	4.2		
12	0.08	4.9	3.8	4.4		
13	0.04	4.6	2.9	3.6		
14	0.03	3.0				
15	0.03	4.3				
Mean		5.6 ± 1.1		7.8 ± 0.8		3.2 ± 0.7

Tabelle VII: Aktivierungsenergien der unidirektionalen Cl-Flüsse. Die angegebenen Flüsse beziehen sich auf 22 °C.

E_{13} (83/105) und E_{31} (83/105) betragen 3.8 und 7.2 kcal/Mol; sie sind mit großer Wahrscheinlichkeit ($p > 0.96$) voneinander verschieden. Aus der Tabelle geht weiter hervor, daß das Kollektiv von Epithelien, mit denen die Messung von E_{13} (83/105) erfolgte, im Mittel einen kleineren Wert für ϕ_{13} (83/105) zeigte als das kleinere Kollektiv, aus dem E_{31} (83/105) ermittelt wurde.

Versuche, in denen unter Verwendung zweier verschiedener Kammern an der einen Hälfte einer geteilten Haut zur die Epithel-

seite, an der anderen nur die Koriumseite auf verschiedene Temperaturen gebracht wurde, während die jeweilige Gegenseite immer die Zimmertemperatur beibehielt, ergaben für Cl-Flüsse gleicher Richtung und bei gleicher Konzentration keine unterschiedlichen Aktivierungsenergien.

Die Energie $E_{31}(0.5/105)$ wurde nicht gemessen, da -wie in C II 1 a beschrieben- bei der Ermittlung des Flusses $\phi_{31}(0.5/105)$ die Möglichkeit der Überlagerung durch den Rückfluß $\phi_{13}(0.5/105)$ bestand; dieser hätte die Messung der Aktivierungsenergie verfälscht.

An Sartorius Filter-Membranen haben wir für den Cl-Fluß eine Aktivierungsenergie von 2.1 ± 0.2 kcal/Mol gefunden. Dies entspricht genau dem Wert, den wir für die Diffusion in wässriger Phase errechnet haben (Abb. 12, E III); im Vergleich dazu betrug die Energie für die Diffusion von PAM an den gleichen Membranen 2.6 kcal/Mol (s. C I 2).

C II 1 e Austauschbare Cl-Zellinnenkonzentration $[Cl]_{ICV}^*$

Nachdem festgestellt wurde, daß sich bei niedrigen wie hohen Cl-Badelösungskonzentrationen die Cl-Zellinnenkonzentration nach 60 - 90 Minuten im Gleichgewicht mit der Außenlösung befanden, wurden alle Hautstückchen 90 Minuten inkubiert. In der Abb. 23 sind die Werte von $[Cl]_{ICV}^*$ gegen die Cl-Konzentration im Außenmedium $[Cl]_{bath.med.}$ im doppelt logarithmischen Maßstab

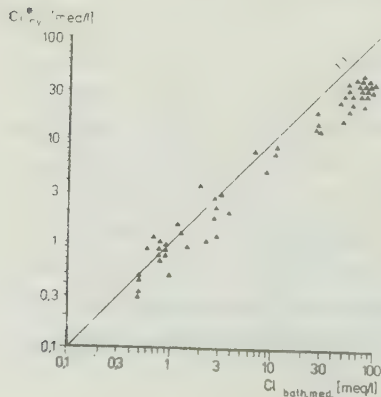


Abb. 23:

Korrelation zwischen austauschbarer Cl-Zell-Innenkonzentration und -Badelösungskonzentration in doppelt logarithmischem Maßstab.

aufgetragen. Im Bereich niedriger Konzentrationen (0 bis 10 meq/l) wird gefunden, daß die gemessene Cl-Zellinnenkonzentration etwa gleich der des Außenmediums ist, bei hohen Konzentrationen (85 meq/l) etwa zweimal kleiner als diese.

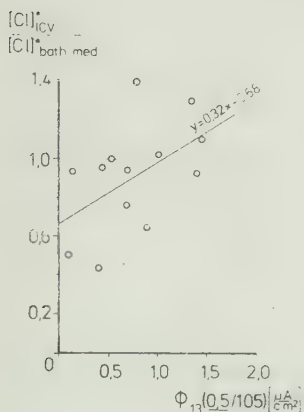


Abb. 24:

Verhältnis von austauschbarer Cl-Zellinnenkonzentration zur Cl-Konzentration der Badlösung in Abhängigkeit zum Cl-Fluß $\Phi_{13}(0.5/105)$. Steigung der Regressionsgeraden ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0.96$ von Null verschieden, Korrelationskoeffizient $\rho = 0.51$.

Die Ergebnisse der Versuche, in denen eine Kombination von Cl-Flußmessung und Cl-Zellinnenkonzentrationsbestimmung erfolgte, sind in Abb. 24 zusammengefaßt. Rechnet man aus den eingezeichneten Punkten die Regressionsgerade aus, so ist deren Korrelationskoeffizient nur 0.51; allerdings ihre Steigung ist mit einer Wahrscheinlichkeit $p = 0.96$ von Null verschieden.

C II 1 f Simultane Messung von gleichgerichteten Cl- und PAH-Flüssen

Die Ergebnisse der Versuche, in denen wir die gleichgerichteten Cl- und PAH-Flüsse simultan gemessen haben, sind in der Tabelle VIII zusammengefaßt. Im oberen Teil dieser Tabelle befinden sich die zu den Influxen und im unteren Teil die zu den Effluxen gehörenden Größen. Die Prozentzahlen $\alpha_{ij}(\text{Cl})$ bzw. $\alpha_{ij}(\text{PAH})$ sind ein Maß für die Abweichung der Beziehung: Teilchenfluß gegen -Konzentration von der Linearität: $\alpha_{ij}(\text{PAH})$

Vers.	C1	PAH	$\phi_{13}(C1/PAH/106)$	$\phi_{13}(C/PAH/106)$	$a_{13}(C1)$	$a_{13}(PAH)$
	meq/l		$\mu A/cm^2$		%	
1	0.5	0.5	0.49	0.013	6	132
	85.0	19.0	4.80	0.65		
2	0.5	0.5	0.15	0.029	62	76
	85.0	19.0	10.60	0.83		
3	0.5	0.5	0.06	0.017	36	102
	85.0	19.0	3.70	0.66		
4	0.5	0.5	0.38	0.012	13	94
	85.0	19.0	8.00	0.42		
5	0.5	0.5	0.36	0.012	13	88
	85.0	19.0	7.7	0.40		
6	0.5	0.5	0.34	0.026	25	78
	85.0	19.0	14.0	0.75		
Mean					22.5	95

Vers.	C1	PAH	$\phi_{31}(C1/PAH/106)$	$\phi_{31}(C1/PAH/106)$	$a_{31}(C1)$	$a_{31}(PAH)$
	meq/l		$\mu A/cm^2$		%	
1	0.5	0.5	0.10	0.049	15	76
	85.0	19.0	2.5	0.14		
2	0.5	0.5	0.033	0.019	102	53
	85.0	19.0	5.7	0.38		
3	0.5	0.5	0.029	0.020	103	87
	85.0	19.0	5.1	0.66		
4	0.5	0.5	0.033	0.025	43	38
	85.0	19.0	2.4	0.36		
5	0.5	0.5	0.10	0.026	26	64
	85.0	19.0	4.4	0.61		
6	0.5	0.5	0.15	0.019	28	66
	85.0	19.0	7.0	0.47		
Mean					53	64

Tabelle VIII: Simultane PAH- und C1-Flußmessungen

$$\alpha_{ij}(C1) = \frac{\phi_{ij}(19/85/106) / \phi_{ij}(0.5/0.5/106)}{170}$$

$$\alpha_{ij}(PAH) = \frac{\phi_{ij}(19/85/106) / \phi_{ij}(0.5/0.5/106)}{38}$$

$$ij = 13, 31$$

bzw. $\alpha_{ij}(C1) = 100$ würde vollkommene Linearität zwischen 0.5 und 19 meq/l für PAH bzw. zwischen 0.5 und 85 meq/l für C1 bedeuten.

Zunächst geht aus dem Vergleich der Spalten 4 und 5 der Tab. VIII hervor, daß zwischen C1- und PAH-In- bzw. -Efflux, also z. B. zwischen $\phi_{13}(0.5/0.5/106)$ und $\phi_{31}(0.5/0.5/106)$ oder zwischen $\phi_{13}(85/19/106)$ und $\phi_{31}(85/19/106)$, usw., keine erkenn-

bare Beziehung besteht. Ebenso wenig scheinen die Größen α_{13} (Cl) und α_{13} (PAH) (bzw. α_{31} (Cl) und α_{31} (PAH)) miteinander korreliert zu sein.

Bei 85 meq/l macht der Cl-Influx im Mittel nur etwa 20 % des Wertes aus, den man auf Grund einer Extrapolation des ϕ -Cl-Diagramms über Cl = 0.5 meq/l hinaus bei exakter Linearität erwarten würde. Für den Cl-Efflux bei 85 meq/l finden wir etwa 50 %. Diese Größen stimmen in etwa mit denen überein, die man aus der Tabelle V erhält: 17 bzw. 36 %.

Der PAH-Influx scheint nach Tabelle VIII nahezu exakt linear mit der PAH-Konzentration verknüpft zu sein, während für den PAH-Efflux eine Abweichung von der Linearität um 36 % zu finden ist.

C II 2 Messungen in "Na-freien Lösungen"

Der unter C I beschriebene Netto-Cl-Transport ist unter Umständen (s. Diskussion) in voller Größe oder wenigstens zum Teil am Gesamtkurzschlußstrom, der in Na-haltigen Lösungen gemessen wird, beteiligt. Schaltet man deshalb den Na-Transport aus, ohne dabei gleichzeitig den Cl-Transport zum Verschwinden zu bringen, so könnte ein negativer SCC in Erscheinung treten, der in einer noch zu bestimmenden Beziehung zum Cl-Transport steht.

Die Applikation von Pharmaka zur Ausschaltung des Na-Transportes scheidet aus, da ihre Wirkung auf den Cl-Transport a priori nicht bekannt ist.

Der Entzug von K auf der Koriumseite hatte trotz mehrmaligen Spülens innerhalb vernünftiger Zeiten kein Verschwinden des positiven SCC zur Folge, wie das von Finn et al. (1967) an der isolierten Krötenblase beobachtet wurde. Das epithelseitige Ersetzen von Na durch K und das Beibehalten der Na-Ringerlösung auf der Koriumseite, wie es von Macey und Meyers (1963) praktiziert wurde, erschien uns nicht zweckmäßig, da unter solchen Bedingungen möglicherweise Diffusionspotentiale auftreten, welche in Anbetracht der zu erwartenden kleinen Potentialdifferenzen sehr störend wären.

Zadunaisky und DeFisch (1964) wählten die Möglichkeit, die Haut auf beiden Seiten mit Lösungen zu spülen, in denen das Na durch Cholin ersetzt wurde. Sie fanden unter diesen Voraussetzungen eine Hemmung des Netto-Cl-Flusses um 80 %. Wir entschieden uns dafür, den Na-Transport ebenfalls durch Entzug von Na auszuschalten. Aus der Tab. I geht hervor, daß die Na-freien Lösungen statt mit MOPS (wie die Lösungen 90/105 bzw. 0/105) mit TRIS gepuffert sind. In einer speziellen Versuchsserie haben wir gefunden, daß die Wahl des einen oder anderen Puffers in Lösungen mit gleicher Cl- und Na-Konzentration auf die Größe von OCV, SCC und die unidirektionalen Cl-Flüsse keinen Einfluß hat.

C II 2 a Verlauf von OCV und SCC beim Behandeln der Haut mit "Na-freien" Lösungen.

Die Abbildungen 25, 26, 27, 28 zeigen einige exemplarische Spannungsverläufe, die wir beim Behandeln der Haut mit Na-freien Lösungen nach Einspannen in die Kammer erhalten haben. Während der mit E markierten Zeitabschnitte erfolgte die Entnahme der beiden Kammerlösungen und die Überprüfung des Asymmetriepotentials der Elektroden. Danach wurde in beide Kammerhälften immer die Lösung eingefüllt, die über dem Schreiberdiagramm angegeben ist. Die unter den Diagrammen stehenden Zahlen haben folgende Bedeutung: die Zahlenpaare der oberen Zeile sind Na-Konzentrationen in meq/l, und zwar die der Epithel- (links) und der Koriumseite (rechts); diese Messungen beziehen sich auf die Lösungen, die in der darüber registrierten Phase entnommen wurden. In der Zeile darunter stehen Kurzschlußströme, die während einer kurzfristigen Unterbrechung der open circuit Bedingungen gemessen wurden; ihre Größe bezieht sich auf die Hautfläche von 5.34 cm^2 . Zu dem Zeitpunkt, an dem eine Na-Zugabe markiert ist, erfolgte auf der Epithel- und Koriumseite eine Na-Konzentrationserhöhung von 0.1 meq/l.

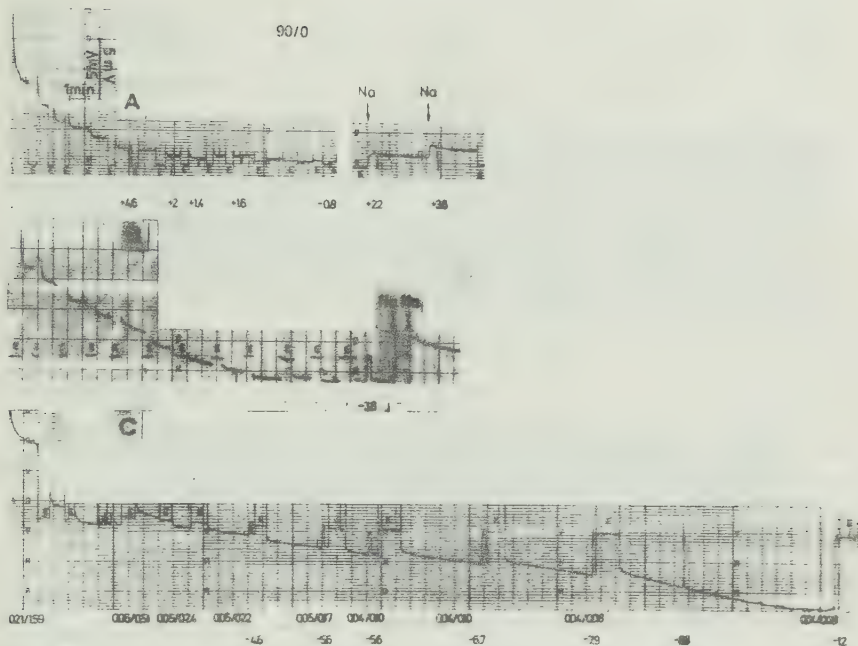


Abb. 25: Beispiele für das Erreichen stationärer Werte von Potentialdifferenz (und Kurzschlußstrom) an 3 verschiedenen Froschhäuten (A, B, C) beim Spülen mit Na-freien Lösungen 90/0.

Na ↑ : Na-Konzentrationserhöhung auf Epithel- und Koriumseite um 0.1 meq/l

In Abb. 25 wird an 3 verschiedenen Häuten (A, B, C) gezeigt, wie groß die quantitativen und qualitativen Unterschiede sein können, wenn eine frisch präparierte Haut mit der Lösung 90/0 wiederholt gespült wird. An der Haut A wird nach etwa 12 Lösungswechseln ein konstantes Potential und ein konstanter Strom von kaum meßbarer Negativität erreicht. Jeder Lösungswechsel bewirkt einen ziemlich definierten OCV-Sprung. Stationäre Verhältnisse stellen sich im Fall B nach ebenso häufigen Spülen ein, nun aber mit einem deutlich negativen Wert für Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom -4 mV/- 3,8 pA. (Wenn im

folgenden von negativen Potentialdifferenzen bzw. Kurzschlußströmen die Rede ist, so bezieht sich das Vorzeichen auf die Verhältnisse, die in Na-haltigen Lösungen angetroffen werden: Koriumseite positiv gegen die Epithelseite.) Im Gegensatz zu A stellt sich in B nach dem Einfüllen einer neuen Lösung zunächst kein stationärer Zustand ein. Dies zeigt noch deutlicher die Haut C: obwohl sich in den letzten 4 gezeigten Phasen die Na-Konzentration weder auf der Epithel- noch auf der Koriumseite wesentlich ändern, sind die Werte von OCV und SCC in dieser Zeit nicht stationär. Schließlich werden stationäre Werte erreicht: $-12 \text{ mV/- } 12 \text{ }\mu\text{A}$.

In den Beispielen A und B wird außerdem dargestellt, welche Reaktion die OCV auf je zwei aufeinander folgende Na-Konzentrationserhöhungen zeigt, nämlich eine, sofort nach Zugabe von Na erfolgende Positivierung von OCV und SCC, die nach der zweiten Zugabe kleiner ist; der zeitliche Verlauf der OCV zeigt die Tendenz zur "Rücknegativierung" (s.u.).

In Abb. 26 soll gezeigt werden, wie unterschiedlich zwei verschiedene Häute A und B auf mehrmalige schrittweise Na-Konzentrationserhöhungen reagieren können, nachdem beide zunächst durch Spülen mit der Lösung 90/0 einen stationären Zustand erreicht haben: Diagramm A: $-9 \text{ mV/- } 21 \text{ }\mu\text{A}$, Diagramm B: $-7,5 \text{ mV/- } 14 \text{ }\mu\text{A}$. A zeigt nach den Zugaben von Na zunächst eine Positivierung von OCV und SCC und anschließend eine praktisch vollständige Regenerierung des SCC, während die OCV von Mal zu Mal positiver wird. In B bewirkt jede Zugabe von Na eine ziemlich definierte Positivierung von OCV und SCC, jedoch wird die Änderung der OCV und des SCC von Mal zu Mal kleiner. Die Na-Analyse der Lösungen, die nach 5maliger Na-Zugabe entnommen wurden, ergibt in A 0.43/0.50 und in B 0.44/0.50 meq/l. Unter Berücksichtigung der Na-Ausgangswerte besteht also auf der Epithel-/Koriumseite am Ende der gesamten Na-Konzentrationserhöhung um 0.5 meq/l ein Defizit an Na von 0.12/0.06 (A) und von 0.12/0.07 (B) meq/l.

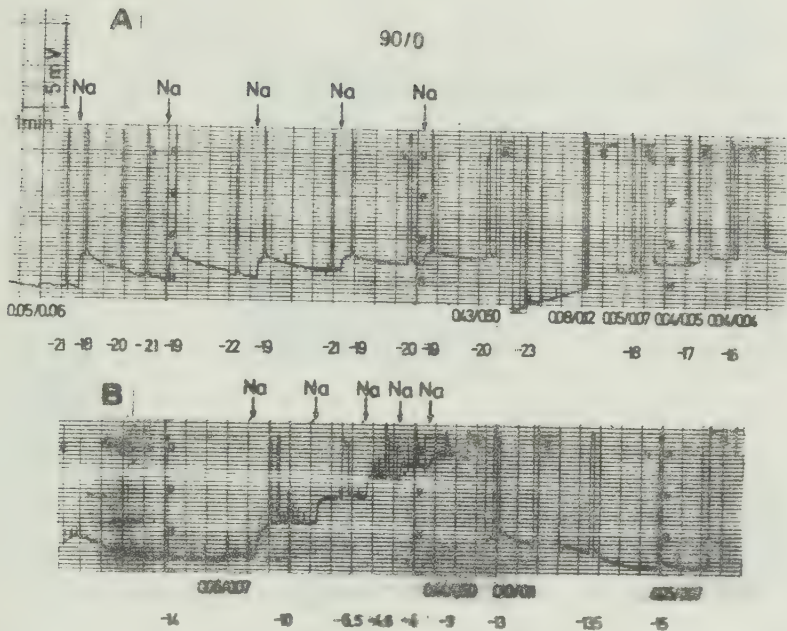


Abb. 26: Reaktion zweier verschiedener Froschhäute (A, B) auf mehrmalige epithel- und koriumseitige Na-Konzentrationserhöhung um je 0.1 meq/l (NaCl)

Unterschiedlich verhalten sich die beiden Häute auch bezüglich der Einstellung ihres Kontrollwertes, wenn sie wieder mit Na-freien Lösungen gespült werden. In A findet zunächst eine über den Kontrollwert hinausgehende Negativierung von OCV und SCC statt, die aber nicht konstant ist: bei der nächsten Spülung liegt bereits ein guter, stationärer Kontrollwert vor. In B wird die Kontrolle von positiveren Werten her, ebenfalls nach der zweiten Spülung erreicht.

C 11 2 b Abhängigkeit zwischen SCC und Cl-Konzentration

In der Abb. 27 wird gezeigt, welche OCV- und SCC-Werte sich einstellen, wenn eine Haut mit Lösungen unterschiedlicher

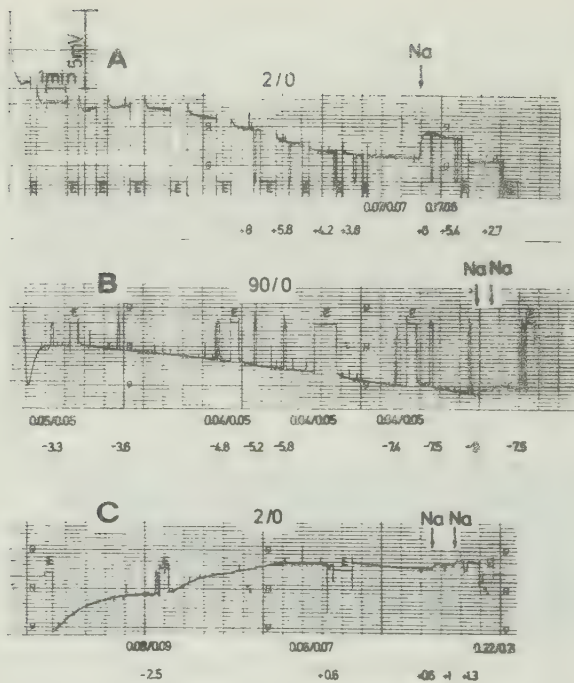


Abb. 27: Transepitheliale Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom einer Haut in Abhängigkeit von 2 verschiedenen Cl-Konzentrationen, 2 und 90 meq/l. Reihenfolge: A 2/0, B 90/0, C 2/0

Na† : s. Abb. 25

Cl-Konzentrationen in der Reihenfolge 2/0, 90/0 und 2/0 gespült werden: in der Phase A ergeben sich die Endwerte + 1.2 mV/ + 3.8 μA, in der Phase B -4.5 mV/ - 8 μA und in der Phase C (Kontrolle) + 0.2 mV/ + 0.6 μA. Am Ende jeder der drei Phasen wird Na zugegeben. Die Änderung von OCV und SCC ist in der Phase A am größten: Δ OCV = 1.2 mV, Δ SCC = 1.6 μA; allerdings ist die Änderung des SCC bei einer Na-Konzentrationserhöhung um 0.1 meq/l kleiner als man erwarten würde,

... kann für den gemessenen Endwert des SCC von + 5.8 μA (vor Zugabe von Na) die in der Lösung a priori vorhandene Na-Konzentration von 0.07 meq/l verantwortlich wäre. Das Spülen der Haut im Anschluß an die Messung der Positivierung durch die Na-Zugabe zeigt einen SCC von + 2.7 μA .

In den Phasen B und C finden nach den beiden Na-Konzentrationserhöhungen kaum meßbare Positivierungen der OCV statt; der Kontrollwert von OCV und SCC in der Phase C ist positiv und von Null kaum unterscheidbar.

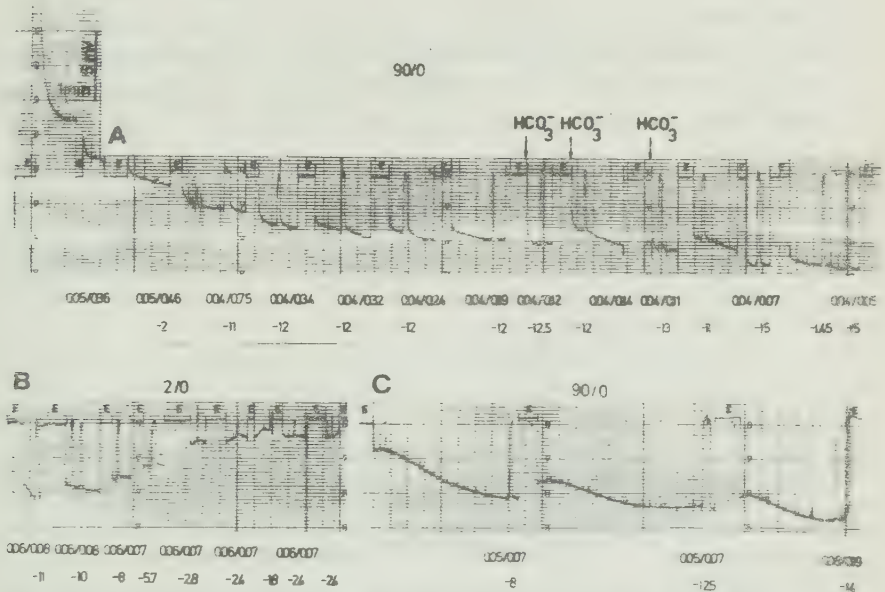


Abb. 28: Transepitheliale Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom einer Haut in Abhängigkeit von 2 verschiedenen Cl-Konzentrationen, 2 und 90 meq/l. Reihenfolge: A 90/0, B 2/0, C 90/0

$\text{HCO}_3^- \downarrow$: Lösung 90/0 wird durch Bikarbonat-haltige normale Ringerlösung ersetzt.

In der Abb. 28 wird ebenfalls an einer Haut die Abhängigkeit der OCV- und SCC-Werte von der Cl-Konzentration gezeigt, wobei jetzt die Lösungsreihenfolge 90/0, 2/0 und 90/0 gewählt

wurde. In A ergeben sich, verglichen am Durchschnitt der insgesamt erhaltenen Werte (s. Tab. IX), relativ große Spannungen und Ströme (~ 7 mV/ ~ 15 μ A); in dieser Phase wird zu den Zeitpunkten, an denen die Zugabe von HCO_3^- markiert ist, die Lösung 90/0 durch eine normale, Bikarbonat enthaltende Ringerlösung mit gleichem pH und gleicher Osmolarität ersetzt; es zeigt sich nach dem zweiten Einfüllen dieser Lösung zwar eine weitere Negativierung der Werte, doch setzt sich diese beim Wiedereinfüllen der Lösung 90/0 fort. In der Phase B gehen OCV und SCC auf -1.5 mV/ -2.4 μ A zurück. In der Kontrollphase C werden die Werte -7.5 mV/ -14 μ A erreicht. Aus den beiden Beispielen (Abb. 27 und 28) geht hervor, daß die Größe der Negativität von OCV und SCC einer Haut mit der Größe der Cl-Konzentration korreliert ist.

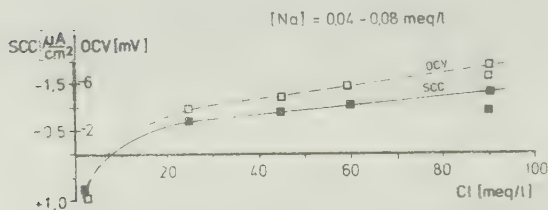


Abb. 29: Abhängigkeit von transepithelialer Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom von der Cl-Konzentration an einer Haut; unterer Wert bei Cl = 90 meq/l entspricht der Kontrolle.

Abb. 29 zeigt ein Beispiel für die genauere Abhängigkeit zwischen OCV, SCC und Cl-Konzentration, die an einer Haut gemessen wurde. Von den je zwei Werten bei 90 meq/l stellt der obere den Anfangs- und der untere den Kontrollwert dar. In diesen Diagrammen ist zu beachten, daß die Na-Konzentration der verwendeten Lösungen von ca. 0.04 meq/l bei 85 meq/l Cl bis 0.08 bei 2 meq/l Cl zunimmt.

In insgesamt 39 Experimenten haben wir die Größen OCV, SCC, L ermittelt, die sich nach wiederholtem Spülen der Haut mit der Lösung 90/0 schließlich stationär einstellten. In der Tab. IX sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Im Mittel hat

Cl meq/l	OCV mV	SCC $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	L mS/cm^2	Na meq/l	n	n ₋	n ₀	n ₊
83	-4.3 ± 5.7	-1.31 ± 1.65	0.31 ± 0.09	0.05	39	28	6	5

Tab. IX: Mittelwerte von den Größen OCV, SCC und L aus n = 39 Experimenten. Erklärung von n₋, n₀, n₊ im Text.

der negative Kurzschlußstrom einen Wert von $-1.31 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Etwa 25 % aller Versuche zeigten keine negativen Werte für OCV und SCC; ca. die Hälfte (n₊) davon waren positiv und die andere Hälfte (n₀) von Null nicht unterscheidbar.

C II 2 c Berechnung der Flüsse $\phi_{13}(83/0)$, $\phi_{21}(95/0)$

In der Abb. 50 sind die Ergebnisse der Versuche wiedergegeben, in denen die Cl-In- bzw. -Effluxe zuerst in Na-haltigen (Na = 105 meq/l) und anschließend in Na-freien Lösungen gemessen wurden. Die Mittelwerte der eingetragenen Cl-In- bzw. -Effluxe bei Na = 105 meq/l betragen 9.4 bzw. 5.6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ und repräsentieren somit recht gut die entsprechenden Werte der Tab. V, die an einem anderen, etwas größeren Kollektiv von Häuten gewonnen wurden. Die in den beiden Diagrammen angegebenen, zu einem bestimmten Fluß gehörenden Größen η geben an, auf welchen Bruchteil der entsprechende Fluß in Na-freier Lösung, bezogen auf den in Na-haltiger, abfällt. Im Mittel ist der Cl-In- bzw. -Efflux in Na-freien Lösungen um 35 bzw. 12 % kleiner als die entsprechenden Flüsse in Na-haltigen Lösungen.

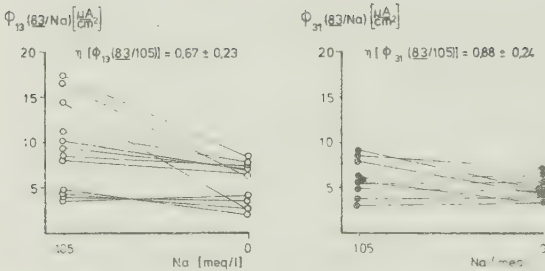


Abb. 30: Abnahme der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse bei Substitution von Natrium durch Cholin.

$$\eta [\Phi_{ij}(83/105)] = \frac{\Phi_{ij}(83/0)}{\Phi_{ij}(83/105)} \quad ij = 13, 31$$

Die mittleren Flüsse $\Phi_{13}(83/0)$ bzw. $\Phi_{31}(83/0)$ berechnen sich also zu:

$$\begin{aligned} \Phi_{13}(83/0) &= \Phi_{13}(83/105) \times \eta [\Phi_{13}(83/105)] = 5.56 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2 \\ \Phi_{31}(83/0) &= \Phi_{31}(83/105) \times \eta [\Phi_{31}(83/105)] = 4.31 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2. \end{aligned}$$

Die dazu nötigen Mittelwerte von η bzw. der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse haben wir der Abb. 30 und der Tab. V entnommen.

Aus dieser Abb. 30 geht weiter hervor, daß die Änderung des Cl-In- bzw. -Effluxes um so größer ist, je höher der Wert des entsprechenden Flusses selbst ist. Aus der Abb. 31, in der

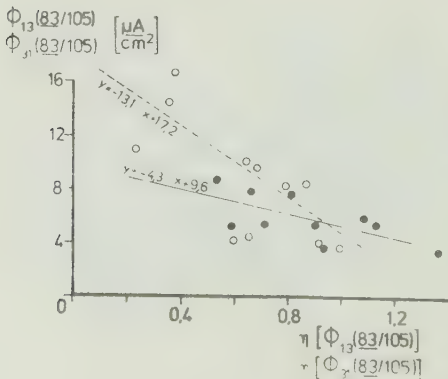


Abb. 31:

Abhängigkeit der Cl-Flüsse $\Phi_{13}(83/105)$ (o) und $\Phi_{31}(83/105)$ (●) von der Größe η dieser Flüsse. Regressionsgerade o--o: Steigung von Null signifikant verschieden ($p > 0.99$); Korrelationskoeffizient $r = 0.72$. Regressionsgerade ●--●: Steigung von Null signifikant verschieden ($p > 0.97$) $r = 0.66$.

Die Regressionsgeraden der Korrelation zwischen den Cl-Flüssen und der Größe η eingezeichnet ist, geht dies deutlicher hervor. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $p > 0.99$ bzw. $p > 0.97$ ist die Steigung der Beziehung zwischen ϕ_{13} bzw. ϕ_{31} und η von Null verschieden.

C II 2 d Beziehungen zwischen Netto-Cl-Transport und SCC

In der Abb. 32 sind die Ergebnisse zusammengefaßt, soweit sie benötigt werden, um den in Na-freien Lösungen gemessenen mittleren negativen Kurzschlußstrom mit dem ebenfalls in Na-freien Lösungen gemessenen Netto-Cl-Transport zu vergleichen:

$$\left. \begin{array}{l} \phi_{13}(83/105) = 8,3 \pm 3,5 \left[\frac{\mu A}{cm^2} \right] \\ \phi_{31}(83/105) = 4,9 \pm 1,6 \left[\frac{\mu A}{cm^2} \right] \\ \eta [\phi_{13}(83/105)] = 0,67 \pm 0,23 \\ \eta [\phi_{31}(83/105)] = 0,88 \pm 0,24 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \phi_{13}^N(83/105) = 3,4 \pm 3,9 \left[\frac{\mu A}{cm^2} \right] \\ \phi_{13}^N(83/0) = 1,3 \pm 3,5 \left[\frac{\mu A}{cm^2} \right] \end{array} \quad \eta [\phi_{13}^N(83/105)] = 0,38 \pm 0,28$$

$$SCC(83/0) = -1,3 \pm 1,7 \left[\frac{\mu A}{cm^2} \right]$$

Abb. 32: Zusammenfassung der Cl-Flußmessungen in Na-haltigen und Na-freien Lösungen und Berechnung des mittleren Netto-Cl-Influges in Na-freien Lösungen: $\phi_{13}^N(83/0)$; die angegebene Größe für SCC (83/0) stammt aus Tabelle IX.

$$\eta [\phi_{13}^N(83/105)] = \frac{\phi_{13}^N(83/0)}{\phi_{13}^N(83/105)}$$

Der Fluß $\phi_{13}^N(83/0)$ ergibt sich zu $1,3 \pm 3,5 \mu A/cm^2$. Der mittlere SCC ist nach Tab. IX $-1,3 \pm 1,7 \mu A/cm^2$. Die beiden Werte sind nicht voneinander unterscheidbar; deshalb kann man über ihre tatsächliche Beziehung zueinander nur anhand weiterer Befunde etwas Definitives aussagen.

Wir haben Experimente durchgeführt, in denen wir an einer geteilten Haut in zwei verschiedenen Kammern Cl-Influx und Cl-

Efflux bestimmten, um dann den errechneten Nettofluß mit dem gleichzeitig gemessenen Kurzschlußstrom zu vergleichen, die Durchführung dieser Experimente verlangt höchst präzise Fluß-, Strom- und Potentialmessungen, vor allem müssen die geteilten Häute in ihren elektrischen Parametern OCV, SCC und L absolut identisch sein, was in der Mehrzahl der Fälle nicht erfüllt ist. Wir haben noch nicht genügend viele erfolgreiche Experimente durchgeführt, um auf Grund ihrer Ergebnisse definierte Aussagen machen zu können, doch ist eine 1 : 1 Korrelation zwischen ϕ_{13}^N (83/0) und SCC (83/0) erkennbar.

Weiter geht aus Abb. 32 hervor, daß der Netto-Cl-Fluß in Na-freier Lösung im Mittel nur noch etwa 40 % des gleichen Flusses in Na-haltigen (Na = 105 meq/l) ausmacht.

D Diskussion

Als Ergebnis der Abhängigkeit des Cl-Transportes von der Cl-Konzentration finden wir zwischen 0 und 83 meq/l einen von Null signifikant verschiedenen Netto-Cl-Influx, der mit grösser werdender Cl-Konzentration einem Sättigungswert zustrebt; dieser könnte etwa bei der Cl-Konzentration einer normalen Ringerlösung (105-115 meq/l) erreicht sein; bei Cl = 83 meq/l beträgt dieser Cl-Influx im Mittel $1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und macht somit ca. 10 % des durchschnittlich gemessenen Kurzschlußstroms aus. Die Größe des von uns gefundenen Netto-Cl-Influsses bei 2 meq/l von ca. $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ stimmt mit der von Martin und Curran (1967), Erlij (1971), Kristensen (1972), Huf (1972) und Fischbarg et al. (1967) gefundenen sehr gut überein. Allein die letztgenannten Autoren haben auch bei höheren Konzentrationen einen Netto-Cl-Influx am südamerikanischen Frosch *L. ocellatus* gefunden: bei Cl = 83 meq/l beträgt dieser ca. $17 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Erlij fand an Froschhäuten der *R. species* nach Präinkubation der noch lebenden Frösche in destilliertem Wasser bei Cl = 2 meq/l Netto-Cl-Inflüsse von $37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$!

Die Größe der Netto-Cl-Flüsse zeigen im ganzen Konzentrationsbereich auch dann sehr große Streuungen, wenn wir uns bei der Auswahl der gemessenen Flüsse auf solche beschränken, die in einem Leitfähigkeitsbereich der Haut von $0.3 \leq L \leq 0.7 \text{ mS}/\text{cm}^2$ ermittelt wurden; wir wählten diesen Bereich, weil die unidirektionalen Flüsse bei hoher Konzentration sehr stark von der Leitfähigkeit abhängen und die meisten dieser Flüsse an Häuten gemessen wurden, deren Leitfähigkeit in diesem Bereich lagen. Da andererseits die unidirektionalen Flüsse bei niedrigen Konzentrationen keine erkennbare Abhängigkeit von L zeigten, war ihre Auswahl nach dem gleichen Kriterium zwar konsequent, aber sie schien mehr oder weniger willkürlich. Offensichtlich gibt es neben der Leitfähigkeit weitere Parameter, von denen die Größe der Flüsse abhängt; als solche kommen z. B. die mechanische Spannung der Haut oder ihre Lipid-Zusammensetzung (Wathington and Harlan, 1969) in Frage.

Im Gegensatz zu den beiden unidirektionalen Flüssen bei kleiner Cl-Konzentration (0-2.5 meq/l), die sich im Mittel um den Faktor 4, in Extremfällen um den Faktor 50 voneinander unterscheiden und deshalb im Experiment leicht differenzierbar waren, wichen diese Cl-Flüsse bei hoher Cl-Konzentration (83 meq/l) im Mittel um weniger als den Faktor 2 voneinander ab und waren in manchen Fällen sogar innerhalb der Fehlerbreite identisch. Der Grund liegt darin, daß der Cl-Influx mit steigender Konzentration einer effektiveren Hemmung unterliegt als der Cl-Efflux. Da geht auch aus dem Vergleich der Werte $\alpha_{17}(\text{Cl})$ und $\alpha_{31}(\text{Cl})$ (Tab. VIII) hervor. In Anbetracht der daraus resultierenden Schwierigkeit, bei hohen Cl-Konzentrationen einen Netto-Fluß nachzuweisen, erschien uns die Beschränkung auf das genannte Leitfähigkeitsintervall gerechtfertigt; möglicherweise ist sie der Grund dafür, daß wir -im Unterschied zu anderen Autoren- einen Netto-Cl-Transport bei höheren Cl-Konzentrationen gefunden haben.

Diese Eigenschaften von Cl-In- bzw. -Effluxen sind völlig verschieden von denen, die für das Na gefunden wurden (Ussing 1958): im Na-Konzentrationsbereich zwischen 20 und 115 meq/l entspricht der Na-Efflux bereits seinem Sättigungswert (den er bei 20 meq/l etwa erreicht hat), während der Na-Influx seinen Maximalwert erst bei der Na-Konzentration von ca. 115 meq/l erreicht. So nimmt das Verhältnis von Na-Influx zu Na-Efflux mit steigender Konzentration zu, statt ab, wie wir es bei Cl gefunden haben.

Aus den in Abb. 15 gezeigten ϕ -Cl-Diagrammen läßt sich entnehmen, daß es für beide unidirektionalen Cl-Flüsse offensichtlich zwei prinzipiell verschiedene Konzentrationsabhängigkeiten gibt, nämlich solche, die entweder im ganzen erfaßten Konzentrationsbereich linear sind, wie auch solche, in denen zwischen 10 und 30 meq/l Flußsättigung erreicht wird. Die Mehrheit dieser willkürlich ausgewählten Korrelationen und auch der Verlauf der Flußmittelwerte von Abb. 17/Mitte, die aus einem wesentlich größeren Kollektiv berechnet wurden, zeigen jedoch eine Kombination dieser beiden Extremfälle: bei Cl-Konzentrationen von

10 - 50 meq/l gehen die Konzentrationsabhängigkeiten beider Flüsse in quasi lineare Bereiche über, deren Steigungen untereinander in etwa übereinstimmen; außerdem liegen sie in der Größenordnung der rein linearen Beziehungen, die in Abb. 15 zu finden sind. Wahrscheinlich liegt der Übergang in den linearen Bereich beim Cl-Influx bei kleineren Cl-Konzentrationen als beim Cl-Efflux.

Die einfachste Interpretation dieser Befunde besteht darin, daß sowohl der Cl-In- wie der Cl-Efflux aus zwei Komponenten bestehen; die Konzentrationsabhängigkeit der einen zeigt Proportional- die der anderen Sättigungskinetik. Wahrscheinlich ist die erstere Komponente diejenige, die den Flüssen beider Richtungen gemeinsam ist; die Sättigungskinetiken der beiden Cl-Flüsse unterscheiden sich dadurch voneinander, daß sich die des Cl-Influsses durch einen größeren Maximalfluß $\phi_{\max}$ und -möglicherweise- durch eine kleinere Halbsättigungskonzentration K_m auszeichnen. Die Lineweaver-Burk-Diagramme von der Konzentrationsabhängigkeiten einzelner Cl-Flüsse, der Mittelwerte der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse (Abb. 17/Mitte) und schließlich auch des Netto-Cl-Influsses (Abb. 17/Unten) sind nicht befriedigend linear, um daraus $\phi_{\max}$ und K_m zu ermitteln; nachdem sich aber die Cl-In- und die Cl-Effluxe offensichtlich aus je zwei Komponenten zusammensetzen, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich; denn die Summe aus einer Sättigungs- und einer Proportionalkinetik, wie auch die Differenz von zwei Sättigungskinetiken mit je zwei verschiedenen Parametern $\phi_{\max}$ und K_m ergeben in einem Lineweaver-Burk-Diagramm prinzipiell keine lineare Korrelation (was sich leicht mathematisch beweisen läßt).

Daß z. B. die Cl-Inflüsse aus zwei Komponenten bestehen, denen auf Grund ihrer unterschiedlichen Kinetik auch ein unterschiedlicher Transportmechanismus zu Grund liegen muß, geht explizit auch aus ihren unterschiedlichen Aktivierungsenergien hervor, die bei verschiedenen Cl-Konzentrationen gemessen werden (Tab. VII): bei den Flüssen ϕ_{13} (0.5/105) liegt die mittlere Aktivierungsenergie (5.4 kcal/Mol) deutlich über der der Flüsse ϕ_{17} (0.1/05) (1.2 kcal/Mol): bestünde der Influx über den gesamten

Konzentrationsbereich aus nur einer Komponente, so müßte seine Aktivierungsenergie in diesem Bereich konstant sein.

Der Mittelwert der Flüsse $\phi_{13}(83/105)$, aus deren Temperaturabhängigkeit die Aktivierungsenergie $E_{13}(83/105) = 4,8 \text{ kcal/Mol}$ berechnet wurde, war -verglichen mit dem Wert der Flüsse $\phi_{31}(83/105)$ - relativ klein (infolge der geringen Zahl an Experimenten und der schon erwähnten großen Streuung der Flußmessungen ist der Mittelwert der 9 Cl-Effluxes sogar größer als der der Cl-Influxe.) Deshalb nehmen wir an, daß die Energie der Flüsse $\phi_{13}(83/105)$ ebenfalls etwas zu klein gemessen wurde, weil die in ihnen enthaltene andere Komponente mit kleinerer Aktivierungsenergie überdurchschnittlich stark am Gesamtfluß beteiligt ist.

Es sind einige andere Untersuchungen in der Literatur zu finden, in denen die Abhängigkeit der Aktivierungsenergie von physikalisch-chemischen Parametern Aufschluß über Zusammensetzung und Mechanismus des betreffenden Teilchenflusses brachte, z. B. Green und Pederson (1972), Leaf (1967), Jacquez et al. (1970).

Die von Fischbarg et al. (1967) an der isolierten Haut des südamerikanischen Frosches *L. ocellatus* gefundenen ϕ -Cl-Diagramme sind, im Gegensatz zu den von uns gefundenen, relativ kompliziert: zwar besitzt der Cl-Efflux eine lineare Beziehung zur Cl-Konzentration ($P = 3.3 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$), doch zeigt der Netto-Cl-Influx erst einen Anstieg zwischen 0 und 5 meq/l, bleibt dann zwischen 5 und 60 meq/l konstant und steigt dann etwa proportional mit der Cl-Konzentration bis mindestens 115 meq/l an. Bei 83 meq/l fanden die Autoren -wie oben schon erwähnt- einen Netto-Cl-Influx von ca. $17 \mu\text{A/cm}^2$.

Durbin (1964) und Finn et al. (1967) fanden an der Magenschleimhaut des Frosches und an der isolierten Krötenblase für die Beziehung zwischen Cl-Fluß und Cl-Konzentration im Mittel eine Sättigungskinetik.

Für die Charakterisierung und das Verständnis eines Teilchentransportes durch eine Membran ist die Kenntnis des Verhaltens seiner unidirektionalen Flüsse aufschlußreicher als die des

Netto-Flusses allein. Doch gibt es Fragestellungen, in denen die Beobachtung des Netto-Flusses genügt oder gar erforderlich ist; in solchen Fällen wäre man also darauf angewiesen, diesen z. B. mit der zwar relativ genauen, aber sehr zeitraubenden Tracermethode aus den unidirektionalen Flüssen zu bestimmen, wie wir es für Cl gezeigt haben.

Handelt es sich bei dem betreffenden Teilchen um ein Ion, so bewirkt sein Netto-Fluß unter Umständen das Auftreten einer Potentialdifferenz (OCV): bekanntlich ist diese Größe kein gutes Maß zur Quantifizierung des betreffenden Teilchentransportes, sondern vielmehr der Strom, der durch die Membran hindurchgeschickt werden muß, um diese OCV auf Null zu kompensieren (Kurzschlußstrom). Läßt sich nun im speziellen Fall zeigen, daß dieser Strom identisch ist mit dem Netto-Transport des betreffenden Teilchens, so stellt er eine ideale Größe dar, dessen Transport zu studieren, wie dies für Na ausführlich geschehen ist. Allerdings kann der Versuch, diese Identität zu beweisen oder zu widerlegen, unterschiedlich schwierig sein. So war er z. B. an der Froschhaut von *R. esculenta* für Na insofern relativ einfach, als der Na-Transport an Größe allen anderen Transporten an der Froschhaut um eine Größenordnung und mehr überlegen ist.

Wir wollen im folgenden überprüfen, ob sich auf Grund unserer Befunde eine Identität zwischen Netto-Cl-Fluß und Kurzschlußstrom ableiten läßt, und zwar unter der speziellen Voraussetzung, daß der Na-Transport soweit als möglich ausgeschaltet ist: Die in Abb. 52 zusammengefaßten Resultate einiger unserer Cl-Untersuchungen und die aus ihnen berechneten Größen zeigen, daß der in Na-freien Lösungen an einem Kollektiv von Häuten gefundene Kurzschlußstrom $SCC(83/0) = -1.3 \mu A/cm^2$ ist, und der Cl-Fluß $\phi_{13}^N(83/0)$ ebenfalls eine Größe von $1.3 \mu A/cm^2$ hat: dieser letzte Wert ist aus Ergebnissen zweier anderer unterschiedlich großer Kollektive von Häuten gewonnen worden; deshalb ist es fragwürdig, diese beiden Größen $SCC(83/0)$ und $\phi_{13}^N(83/0)$ dem Student-Test auf Signifikanz ihrer Unterschiedlichkeit zu unterziehen. Wendet man ihn dennoch an, so ergibt sich, daß die beiden Zahlenwerte mit geringer Wahrscheinlichkeit ($p < 0.5$) voneinander verschieden sind. Damit ist ihre

Identität zwar wahrscheinlich, doch nicht bewiesen; Zum Beweis müssen also weitere Argumente angeführt werden, die einer Identität nicht widersprechen.

Zunächst muß eine Abschätzung erfolgen über die durchschnittliche Positivierung des mittleren negativen SCC durch die in der Lösung 90/0 enthaltene Na-Konzentration von 0.04 meq/l: in den Abb. 25, 26 und 27 wurde gefunden, daß die Größe der Positivierung von OCV und SCC nach der Na-Konzentrationserhöhung sehr unterschiedlich war. Nehmen wir an, die Änderung des SCC nach erfolgter Na-Zugabe sei ausschließlich auf den Na-Transport zurückzuführen, so lag die durch ihn bedingte Positivierung bei einer Konzentrationserhöhung von 0.1 meq/l zwischen den Extremwerten 0 und $0.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, im Mittel also bei etwa $0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Die Na-Konzentration der Lösungen 90/0 von 0.04 meq/l (s. Tab. I a) würde demnach eine mittlere Positivierung von $0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bewirken; infolgedessen wäre bei völliger Abwesenheit von Na in dieser Lösung maximal ein mittlerer SCC von $-1.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (statt $-1.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) gemessen worden. Dieser Wert ist aber ebensowenig vom gefundenen Netto-Cl-Fluß signifikant verschieden, wie der experimentell ermittelte. Man beachte dabei, daß die angenommene mittlere Stromänderung von $0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pro 0.1 meq/l Na einem Strom von $40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei 10 meq/l entsprechen würde, wenn man Proportionalität zwischen Na-Konzentration und SCC im Bereich von 0 bis 10 meq/l annimmt. Dieser Wert ist relativ groß angenommen worden, wenn man bedenkt, daß bei etwa zehnfacher Na-Konzentration (100 meq/l) im Mittel Kurzschlußströme von nur $30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gefunden werden.

Wenn also auch der Effekt der geringen Na-Konzentration in der Lösung 90/0 auf die mittlere Größe des negativen Kurzschlußstromes nicht exakt quantifizierbar ist, so läßt sich doch sagen, daß die völlige Abwesenheit von Na einen nur unwesentlich größeren negativen SCC zur Folge gehabt hätte.

Wie Tab. V zeigt, wären Na-Flußmessungen wesentlich höherer Genauigkeit, als es unseren Ergebnissen entspricht, notwendig gewesen, um aus dem Vergleich zwischen Netto-Na-Fluß und Kurzschlußstrom entscheiden zu können, inwieweit der Netto-Cl-Fluß am Gesamtkurzschlußstrom in Na-haltigen Lösungen beteiligt ist.

Dies scheint sehr schwierig zu sein, anderenfalls wären Hinweise auf den Cl-Transport an der Haut von *R. esculenta* in Na-haltigen Lösungen schon früher, gerade auf Grund einer Diskrepanz zwischen SCC und Netto-Na-Fluß, gefunden worden. Stattdessen haben z. B. Aceves und Erlj (1971) die schon von Ussing und Zerahn (1951) gefundene Identität auch am isolierten Epithel bestätigt.

Ein wichtiges Argument, das für die Identität von $\bar{J}_{13}^N(83/0)$ und SCC (83/0) spricht, ist die enge Korrelation, die zwischen SCC (Cl/0) und der Cl-Konzentration gefunden wurde.

Die Voraussetzungen dafür, daß dem Netto-Cl-Transport an der Froschhaut in Na-freien Lösungen ein exakt gleichgroßer Kurzschlußstrom entspricht, sind:

1. Dem Cl-Transport darf an der gleichen Haut kein anderer, von ihm unabhängiger Netto-Ionen-Transport ähnlicher Größenordnung überlagert sein;
2. Das Cl-Ion darf mit keinem anderen transportierten Ion in Form eines Counter- oder Co-Transportes in Wechselwirkung stehen.

Ad. 1.

Nach unserer Kenntnis werden zur Zeit außer dem Na- und Cl-Transport keine weiteren transepithelialen Elektrolyt-Transporte an der isolierten Froschhaut diskutiert. Dagegen ist bekannt, daß die Froschhaut von *R. pipiens* in vivo und in vitro eine transepitheliale pH-Differenz von 2 - 4 pH-Einheiten aufzubauen in der Lage ist (Fleming 1957, Friedman et al. 1967, Emilio et al. 1970). Man nimmt an, daß diesem Befund die intrazelluläre Hydrolyse oder die Hydratation von metabolisch entstehendem CO_2 , mit nachfolgendem Transport von H-Ionen auf die epithel- und von OH^- bzw. HCO_3^- -Ionen auf die Koriumseitige Badlösung zugrunde liegt; für die Alkalinisierung der Koriumseite werden zusätzlich auch der Auswasch von HCO_3^- und Laktat aus dem koriumseitigen Pool und der K- H-Austausch diskutiert. Emilio et al. (1970) finden an der Haut von *R. pipiens*, daß der maximale pH-Gradient vom SCC, der während des Aufbaus dieses Gradienten gemessen wurde, unabhängig ist.

Aus den Ergebnissen von Emilio errechneten wir, daß derjenigen epithelseitigen H-Sekretionsrate, die nachweislich auf der Koriumseite mit einer gleichgroßen Produktion von basischen Äquivalenten verbunden ist, ein Fluß von ca. $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ entspricht; dies käme maximal einem Kurzschlußstrom von $- 1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gleich; denn man kann die beiden transmembranalen Flüsse von Ionen unterschiedlichen Vorzeichens, die intrazellulär entstehen und in entgegengesetzte Richtung orientiert sind, formell als einen transepithelialen Kationen-Efflux oder Anionen-Influx betrachten.

Die geschilderten Befunde wurden in Na-haltigen Lösungen an der Frosch-Spezies *R. pipiens* erhoben. Wir haben an der Haut von *R. esculenta* in den gleichen Lösungen, wie sie von Emilio verwendet wurden, keine pH-Verschiebungen auch nur ähnlicher Größe beobachten können. Allerdings haben wir -wie in B III 4 beschrieben- festgestellt, daß sowohl auf der Epithel- wie auch auf der Koriumseite Substanzgemische ausgewaschen wurden, (deren Zusammensetzung nicht weiter analysiert worden ist): es wäre denkbar, daß sich darunter Substanzen befinden, die als Puffer wirken und somit trotz vorhandener H-, OH- und HCO_3 -Sekretion eine pH-Konstanz der Badelösungen vorgetäuscht worden wäre. In den Untersuchungen von Emilio wurden aber wenigstens für die epithelseitigen Lösungen nach der Inkubation mit der Haut die gleichen Titrationskurven gefunden wie vor der Inkubation. Da dieser Befund auch für die Haut von *R. esculenta* gültig sein dürfte, ergibt sich, daß an dieser Haut sicher keine H- bzw. OH- und HCO_3 -Sekretion ähnlicher Größe wie bei *R. pipiens* existiert; möglicherweise gilt diese Aussage noch verstärkt bei Verwendung Na-freier Lösungen, zumal für Kurzschlußbedingungen.

Damit ist gezeigt, daß an der Haut von *R. esculenta* zwar wahrscheinlich ein weiterer "Netto" Ionenfluß existiert, daß dieser jedoch um Größenordnungen kleiner ist als der Netto-Cl-Fluß; somit ist also für den Cl-Transport die Voraussetzung 1 erfüllt.

Ad 2.

A priori folgt aus der Existenz des Netto-Cl-Flusses nicht zwangsläufig, daß auch ein diesem Fluß äquivalenter Kurzschlußstrom gemessen wird; denn sobald auch nur ein Transportschritt des Cl-Ions in Form eines Counter- oder Co-Transportes mit einem Ion entsprechender Ladung stattfindet, wird, je nach dem Ausmaß dieser Kopplung, ein bestimmter Prozentsatz des transepithelialen Cl-Flusses elektrisch neutral und der ihm entsprechende SCC um diesen Prozentsatz kleiner sein als der Netto-Cl-Fluß.

Jedoch haben wir ausführlich gezeigt (Abb. 21, 22), daß keine Kopplung des Cl-Flusses mit dem aktiven Na-Transport nachweisbar ist; eine Kopplung mit dem oben beschriebenen formellen Anionen-Influx bzw. Kationen-Efflux könnte höchstens einen Netto-Cl-Efflux zur Folge haben; tatsächlich messen wir aber einen Cl-Influx. Es scheint demnach auch Voraussetzung 2 erfüllt zu sein.

Da einerseits nachgewiesen wurde, daß die gefundene Asymmetrie der Froschhaut auch bezüglich des Cl-Ions weder auf einer Kopplung mit dem Na-Transport beruhen kann, noch durch eine Wechselwirkung mit den transmembranalen Transporten erklärbar ist, die zum Aufbau eines transepithelialen pH-Gradienten führen, und da andererseits keine weiteren Transporte an der Froschhaut bekannt sind, mit denen der Cl-Fluß in Wechselwirkung stehen könnte, nehmen wir an, daß die von uns gefundene zahlenmäßige Übereinstimmung der Werte $\bar{J}_{Cl}$ ($\bar{I}/O$) und SCC (I^-/O) einer tatsächlichen Identität der beiden Größen entspricht und kein zufälliges Ergebnis darstellt.

Aus der gefundenen Identität folgt, daß der in Na-haltigen und Na-freien Lösungen gefundene Netto-Cl-Transport ein primär aktiver Transport ist und daß der in Na-haltiger Ringerlösung gefundene (positive) Kurzschlußstrom die Summe von aktivem Na- und dem gleichsinnig orientierten aktiven Cl-Transport darstellt.

Im Unterschied zu den anderen Autoren, die den aktiven Charakter des Netto-Cl-Influsses bei kleiner Cl-Konzentration z. B.

aus seiner Vergiftbarkeit durch DNP oder JAA oder seiner Hemmbarkeit durch Ouabain abgeleitet haben, kommen wir ohne pharmakologische Eingriffe in das epitheliale Geschehen auf Grund von Cl-Flußmessungen und thermodynamischen Überlegungen zum gleichen Schluß, und erweitern diese Aussage auf den Cl-Konzentrationsbereich zwischen 0 und 85 meq/l.

Nachdem der aktive Charakter des Netto-Cl-Influsses bewiesen ist, muß schließlich die Frage entschieden werden, welcher der beiden Komponenten des Cl-Influsses diese Eigenschaft zugesprochen werden muß. Nachdem die Komponente mit der Proportional-kinetik aller Wahrscheinlichkeit nach den Flüssen beider Richtungen gemeinsam ist, nehmen wir an, daß sie passiv ist; folglich ist die zweite, sättigbare Komponente des Cl-Influsses der aktive Anteil, welcher die Asymmetrie des Cl-Transportes bedingt; ob die zweite, sättigbare Komponente des Cl-Effluxes aktiv oder passiv ist, können wir mit dem vorliegenden Material nicht definitiv entscheiden.

Kristensen (1972) fand, daß beim Anlegen von transepithelialen Potentialdifferenzen ($-60 < PD < +60$ mV) bei kleinen Cl-Konzentrationen von 2 - 4 meq/l der Cl-Efflux sehr gut die Goldman-Gleichung (Goldman 1943/44, Levi und Ussing 1949) erfüllte (Änderung des Flusses um etwa den Faktor 4 bei Änderung der Potentialdifferenz um 100 mV), während der Netto-Cl-Influx keine meßbare Potentialabhängigkeit im gleichen mV-Bereich zeigte. Nachdem sowohl an den Cl-In- als auch Cl-Effluxen bei kleinen Cl-Konzentrationen hauptsächlich die sättigbaren Komponenten beteiligt sind, sagen diese Befunde aus, daß die beiden Komponenten einen unterschiedlichen Transportmechanismus besitzen müssen, der Efflux also möglicherweise passiv ist. Da die Goldman-Gleichung die Potentialabhängigkeit eines Ionenflusses durch ein einzelnes Diffusionshindernis beschreibt, liegt die Vermutung nahe, daß die sättigbare Komponente des Cl-Effluxes einen Fluß durch die Interzellularen und die tight junctions darstellt.

Zadunaisky und DeFisch (1964) fanden an der Froschnaut in Na-freien Lösungen, daß der negative Kurzschlußstrom kleiner ist,

als der Netto-Cl-Fluß; das gleiche Ergebnis erhielten Finn et al. (1967) an der Krötenblase. Die Autoren folgerten daraus, daß am Kurzschlußstrom zelluläre, metabolische Produkte oder andere Kationen-Influxe bzw. Anionen-Effluxes beteiligt sind.

Im Vergleich zu den beschriebenen Konzentrationsabhängigkeiten der Cl-Flüsse an der Froschhaut zeigen die der PAH-Flüsse ein etwas einfacheres Bild (Tab. III): sowohl PAH-Influx wie -Efflux zeigen innerhalb 2 - 20 meq/l nahezu lineare Abhängigkeiten von der PAH-Konzentration. Die Flüsse verschiedener Richtung sind innerhalb dieses Bereiches bei gleicher Konzentration unsignifikant voneinander verschieden. Allerdings finden wir bei 0.5 meq/l einen von Null signifikanten Netto-PAH-Efflux, der bei gleicher Konzentration etwa um den Faktor 10 kleiner ist als der Netto-Cl-Influx ($0.017 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Daß über den gesamten Bereich von 0 - 20 meq/l für den PAH-Influx, im Gegensatz zum -Efflux, eine ziemlich exakt lineare Abhängigkeit zu bestehen scheint, geht aus dem Vergleich der Werte von $\alpha_{13}(\text{PAH})$ und $\alpha_{31}(\text{PAH})$ (Tab. VIII) hervor: im Mittel besteht für den PAH-Influx bei 20 meq/l, bezogen auf den Fluß bei 0.5 meq/l eine Abweichung von der Linearität von nur 5 %, während für den PAH-Efflux eine von 36 % gefunden wird. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis dafür, daß für den PAH-Fluß an der Froschhaut eine Asymmetrie besteht. Daß wir diese Eigenschaft bei höheren PAH-Konzentrationen nicht finden, dürfte daran liegen, daß dort die, beiden unidirektionalen PAH-Flüssen gemeinsame Komponente gegenüber dem kleinen Netto-Efflux dominiert.

Infolge der Kleinheit des gefundenen Netto-PAH-Effluxes haben wir nicht weiter die Frage untersucht, ob er die Folge einer Flußkopplung darstellt oder als ein primär aktiver Transport interpretiert werden kann. Aus der fehlenden Korrelation zwischen simultan gemessenen Cl- und PAH-Flüssen, bzw. zwischen $\phi_{ij}(\text{Cl})$ und $\phi_{ij}(\text{PAH})$ folgt, daß zumindest eine Korrelation zwischen Cl- und PAH-Flüssen ausgeschlossen werden kann.

Eine Beziehung zwischen der Leitfähigkeit der Haut und PAH- In- bzw. -Effluxen bei verschiedenen PAH-Konzentrationen wurde nicht gefunden.

Diese Befunde vom Netto-Efflux an der Froschhaut stimmen mit denen überein, die von Deetjen und Sonnenberg (1965) am Tubulus der Ratte gefunden wurden: eine Reihe schwacher organischer Säuren wie PAH, Diodrast, Phenolrot, Penicillin, Sulfoamide u.a.m. werden von den Zellen des proximalen Konvoluts aus dem peritubulären Blut extrahiert und über den Harn ausgeschieden. Diese Substanzen sind Fremdstoffe für den Organismus, die im Stoffwechsel nicht anfallen und diesen Ausscheidungsweg offenbar nur zufälligerweise benutzen können.

Die weiterhin gefundenen Unterschiede der Transportqualitäten von Cl und PAH sind auf Grund ihrer verschiedenen Masse, räumlichen Ausdehnung, Ladungsverteilung, usw., nicht weiter verwunderlich:

Die mittlere PAH-Permeabilität ist um etwa eine Größenordnung kleiner als die angenähert ausgerechnete Permeabilität des Cl-Effluxes. Im Unterschied zu Cl finden wir bei den PAH-Flüssen weder bei kleinen noch bei großen Konzentrationen eine erkennbare Beziehung zur Leitfähigkeit, die wir -wie üblich- aus Leerlaufspannung (460 mV) und Kurzschlußstrom errechnet haben. Aus den Untersuchungen über die PD-Abhängigkeit der PAH-Flüsse (Abb. 13, 14) geht andererseits hervor, daß die Vergrößerung der Flüsse ϕ_{31} (20) in dem Bereich der angelegten Spannungen, in dem sich L nicht nennenswert änderte, sehr unterschiedlich war und weit unter dem Wert lag, der nach der Goldman-Gleichung zu erwarten gewesen wäre. Erhöhte man allerdings die PD über eine Grenze hinaus, so fand sowohl bei L als auch bei ϕ_{31} (20) eine sprunghafte Vergrößerung statt. Wir haben keine schlüssige Erklärung für die kleine oder in manchen Fällen sogar fehlende PD-Abhängigkeit der PAH-Flüsse im Bereich kleiner PD-Werte. Der Anteil des Netto-PAH-Effluxes am Gesamt-PAH-Fluß ist so klein, daß er für das gefundene Verhalten nicht verantwortlich gemacht werden kann. Besteht aber für den transepithelialen PAH-Fluß nur eine einzige Diffusionsbarriere, z. B. die tight junctions, so könnte man das Nichterfüllen der Goldman-Gleichung z. B. so erklären, daß PAH diese Barriere als **undissoziierte Säure** passiert.

Die gefundene Parallelität von L und $\emptyset$ (PAH) bei hohen angelegten Spannungen (Abb. 13, 14) führen wir auf eine spannungsinduzierte Strukturänderung des Epithels zurück, die in allen beobachteten Fällen reversibel war. Es liegt nahe, daß diese Strukturänderung infolge der relativ kleinen Spannungen zumindest die Anfangsphase des an der Froschhaut (und auch an anderen biologischen Membranen) bekannten elektrischen Durchschlags darstellt, der bei hyperpolarisierenden Spannungen von 200 - 250 mV auftritt, Finkelstein (1961), Lindemann (1970), Candia (1970). Bekanntlich ist der Zustand des Durchschlags durch extrem hohe Leitfähigkeit charakterisiert.

Mandel und Curran (1972) finden an der Froschhaut von *R. pipiens* beim Anlegen von Spannungen bis zu +100 mV keine Änderung der Harnstoff-Permeabilität: dagegen verdoppelt sie sich etwa bei Spannungen von -100 mV: diesen Anstieg führen die Autoren auf eine reelle Permeabilitätsänderung der Haut zurück und nicht etwa auf das Vorliegen eines elektroosmotischen Effekts.

Die geringe Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Potentialdifferenz (Abb. 13, 14), (wenn diese im Bereich von mV-Werten liegt, die das Froschepithel spontan erzeugt), rechtfertigt unsere Berechnung von L aus dem Quotienten SCC/OCV .

Bei der Diffusion in rein wässriger Phase scheint PAH im Gegensatz zu Cl eine größere Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel Wasser zu besitzen, denn seine Aktivierungsenergie von 2.6 kcal/Mol liegt signifikant über dem theoretischen Wert von 2.1 kcal/Mol, der für Cl tatsächlich gefunden wurde.

An der Froschhaut zeigen die PAH-Flüsse bei hoher Konzentration eine Aktivierungsenergie von etwa 4 kcal/Mol; diese liegt deutlich über dem Energiewert, der für den Cl-Efflux bei 83 meq/l erhalten wurde und in dem Bereich der Energie des Cl-Influges bei 83 meq/l, aber unter dem Energie-Mittelwert, der für die Flüsse $\emptyset_{13}$ (0.5/105) gefunden wurde.

Wie aus den Abb. 30 und 31 hervorgeht, hängt der Netto-Cl-Fluß von der Konzentration der gegeneinander ausgetauschten Kationen Natrium und Cholin ab: ersetzt man das gesamte Na der verwendeten Lösung durch Cholin, so geht der Netto-Cl-Fluß im Mittel auf 40 % seines Kontrollwertes zurück; diese Verkleinerung beruht zum größeren Teil auf der Hemmung des Cl-Influsses, denn er wird bei Entzug von Na um 33 %, der Eflux aber nur um 12 % verkleinert. A priori ist es nicht möglich, darüber zu entscheiden, ob die Hemmung des Cl-Transportes primär durch die Abwesenheit von Na oder die Anwesenheit von Cholin (oder beides) bedingt ist. Die Ionenstärke unserer Na-Ringerlösung (90/105) ist nur um 16 % größer als die der Cholin-Ringerlösung 90/0, s. Tab. Ia, Ib. Cholin ($MG \approx 100$) wird an der Froschhaut nicht aktiv transportiert, die obere Grenze seiner Permeabilität liegt bei ca. 2×10^{-7} cm/sec, Kirschner (1960).

Da wir bewiesen haben, daß die Asymmetrie der Froschhaut gegenüber den Cl-Flüssen nicht als die Folge einer Wechselwirkung mit dem gleichsinnig orientierten Na-Transport interpretiert werden kann, ist die Reduzierung des Cl-Transportes bei Entzug von Na primär kein "Na-Fluß-Effekt" sondern ein "Na- bzw. Cholin-Konzentrations-Effekt".

Die Abhängigkeit des Cl-Transportes von der Na-Konzentration an der Froschhaut ist aus der Literatur bekannt: Linderholm (1954); Macey und Meyers (1963) fanden an *R. pipiens*, daß die Cl-Leitfähigkeit ($= F^2/RT \times \phi(Cl)$, Linderholm 1954), also auch der Cl-Fluß nach Ersatz von Na durch K um so mehr abnahm, je größer die Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen war (s. Abb. 31): die von ihnen gefundene mittlere Abnahme betrug ca. 40 %. Zadunaisky und DeFisch (1964) erhielten für den Cl-Influx und den -Outflux an *L. ocellatus* eine Abnahme von je 0 %, wenn sie in der normalen Ringerlösung alles Na gegen Cholin ersetzten.

Die Abhängigkeit des aktiven Cl-Transportes von der Na-Konzentration ist von Zadunaisky (1972) an der Frosch-Cornea genauer untersucht worden; es wird gefunden, daß Na zwar die Affinität

des Cl-Ions zum Transportsystem, nicht aber die Halbsättigungskonzentration ändert; demnach verhält sich also Na im Bezug auf das Cl nicht als Kompetitor.

Entgegen den Befunden von Koefoed-Johnsen und Ussing (1958) und Ussing (1960), wonach der Übergang von Cl- zu SO_4 -Ringer eine Erhöhung der OCV aber keine Änderung des SCC bewirken soll, finden wir (Abb. 19), daß die OCV im Mittel um ca. 20 % und der SCC um ca. 40 % abnehmen. An der Froschhaut sind ähnliche Befunde von Fischbarg et al. (1967) und von Ferreira (1968) gefunden worden. Ferreira zeigte, daß die Osmolarität einer Ringerlösung von 220 auf 140 mosm/l abnahm, wenn in ihr Cl durch SO_4 ersetzt wurde, (was wir allerdings nicht bestätigt fanden, s. Tab. Ia, Ib); mit dieser vergleichsweise hypotonen Lösung fand Ferreira den Effekt der OCV-Erhöhung: Diese blieb aus, wenn diese Lösung mit 80 mM/l Mannitol oder Glucose osmotisch "kompensiert" wurde; dagegen wurde jetzt der SCC im Mittel um 50 - 60 % im Vergleich zum Kontrollwert in Cl-Ringerlösung erniedrigt.

Ferreira untersuchte weiterhin die Anionenabhängigkeit des SCC. Ordnet man nach diesen Befunden die Anionen nach ihrer Fähigkeit ein, den SCC zu hemmen, so ergibt sich, bezogen auf Cl, folgende Sequenz: Cl (100 %), Br (86 %), J (85 %) und SO_4 (40-50 %).

Bei der Hemmung des Na-Transportes nach Ersatz von Cl durch SO_4 ist es schwierig, darüber zu entscheiden, ob dafür primär die Abwesenheit von Cl oder die Anwesenheit von SO_4 (oder beides) verantwortlich gemacht werden kann: möglicherweise ist an dem Ausmaß dieser Hemmung auch die im Vergleich zur Cl-Ringerlösung um etwa 50 % höhere Tonenstärke der SO_4 -Ringerlösung beteiligt; dies wäre also ein indirekter Effekt, der von der Abwesenheit von Cl bzw. der Anwesenheit von SO_4 herrührt. Die Permeabilität der Froschhaut für SO_4 ist sehr klein: 3×10^{-3} cm/sec, Smith et al. (1971).

Wie oben diskutiert, wird mit großer Wahrscheinlichkeit der Netto-Cl-Fluß durch einen äquivalenten negativen Kurzschluß-

strom repräsentiert; folglich kann der in Na-haltigen Lösungen gefundene (positive) SCC als die algebraische Summe von mindestens zwei aktiven Transporten aufgefaßt werden. Die in der Abb. 20 angegebene Größe $\eta[\text{SCC}(2/105)] = 0.58$ gibt aus diesem Grund nicht genau die Wirkung des Cl-Entzuges auf den Netto-Na-Fluß wider, weil die Anwesenheit von 83 meq/l Cl selbst einen Beitrag zum gesamten Kurzschlußstrom verursacht. Da der gefundene Netto-Cl-Influx ca. 10 % des SCC ausmacht, muß man also die wahre Größe von η um diesen Prozentsatz kleiner annehmen, d. h. sie ist in Wirklichkeit ca. 0.52. Da der Netto-Cl-Fluß im Mittel um etwa 10 % des Netto-Na-Transportes ausmacht, ist die gefundene Abhängigkeit des SCC von der Cl-Konzentration wohl kaum auf eine Flußkopplung zurückzuführen. Die Hemmung des SCC um ca. 50 % durch Entzug von Cl ist also ein Konzentrationseffekt.

Der aktive Na-Transport an der Kaninchen-Cornea hängt ebenfalls partiell von der Cl-Konzentration ab (Zadunaisky, 1966).

Für die oben dargestellten Befunde, daß einerseits der aktive Cl-Transport von der Wahl der Kationen (Na oder Cholin) und andererseits der aktive Na-Transport von der Wahl der Anionen (Cl oder SO_4) abhängt, dürften mehrere Gründe verantwortlich sein, über die wir mit dem vorliegenden Material nicht entscheiden können. Eine Ursache könnte darin bestehen, daß die verwendeten Lösungen bezüglich ihrer Ionenstärke, Art und Konzentration der verwendeten Ionen Einfluß auf die Membraneigenschaften haben und somit ihre Transporteigenschaften ändern. Denn die Membran-Makromoleküle sind Ampholyte, d. h. die tragen positive und negative Ladungen. Z. B. besitzen die Phospholipide Amino-, Guanidino- und Imidazo-Gruppen als mögliche Quellen positiver Ladungen und Karboxyl-Gruppen als mögliche Quellen negativer Ladungen. Zwischen diesen "Fixladungen" und den beweglichen Ionen bestehen starke elektrostatische Coulombsche Wechselwirkungen, welche ihrerseits Strukturveränderungen dieser Makromoleküle zur Folge haben können.

Anhaltspunkte, welche die Richtigkeit dieser Vorstellungen an der Frochshaut stützen, sind z. B. die pH-Abhängigkeit des Na- und Cl-Transportes, Ussing (1949), Schoffeniels (1955), Runder et al. (1967), die pH-Abhängigkeit der Kationenselektivität, Pesente (1960), oder die Befunde, die auf die Existenz von Austauschmechanismen Na/H, Na/K oder Cl/HCO₃ schließen lassen. Krogh (1937), Huf und Wills (1951), Garcia-Romeu (1971). Interessante Befunde über anionen- und kationenspezifische Änderungen bestimmter Membraneigenschaften wurden z. B. an der Krötenblase, (Singer und Civan, 1971) und an dem Tintenfisch Riesen-Axon, (Tasaki et al., 1965) erhoben.

Bei der Interpretation der Messungen von austauschbaren Cl-Zellinnenkonzentrationen $[Cl]^*_{ICV}$ (Abb. 23, 24) müssen wir von vornherein einen Fehler in Betracht ziehen: der für die Berechnung von Zellinnenkonzentrationen benötigte Inulinraum ist sicher um einen beträchtlichen Wert kleiner als der tatsächliche Extrazellulärraum der Frochshaut: Dies geht aus Abschätzungen mit Hilfe elektronenoptischer Aufnahmen von Frochshautschnitten hervor (Dörge, 1972). Diese Reinkalkulation, die darauf beruhen dürfte, daß Inulin während der Inkubationszeit von 1 - 2 hr bestimmte Teile des ECV nicht erreicht, bedingt bei der Berechnung der Zellinnenkonzentration unterschiedlich große Fehler: Ist die tatsächliche Konzentration des ICV gleich der des ECV, so ist theoretisch der Fehler gleich Null; ist aber die tatsächliche Konzentration des ICV größer (kleiner) als die des ECV, so werden die Konzentrationen des ICV prinzipiell zu klein (zu groß) gemessen.

So folgt aus der bei einer Badelösungskonzentration von 90 meq/l gefundenen Zellinnenkonzentration von 55 meq/l, daß sie in Wirklichkeit kleiner ist. Aus Konzentrationsmessungen an der Frochshaut mit Hilfe der Mikro-Elektrodensonde hat Dörge (1972) intrazelluläre Gesamt-Cl-Konzentrationen von 55 ± 10 meq/l gefunden, wenn die Haut in Ringerlösungen mit Cl = 115 meq/l inkubiert wurde. Der (aus Abb. 23) extrapolierte Wert der Zellinnenkonzentration bei Cl = 115 meq/l im Inkubationsmedium beträgt 40 - 45 meq/l.

Diese Konzentration liegt deutlich unter der von Dörge gefundenen. Da die intrazellulären Proteine bei physiologischen pH-Werten in anionischer Form vorliegen, dürfte die Diskrepanz zwischen austauschbarem und Gesamt-Cl im Zellinneren nicht durch die Proteinbindung des Cl bedingt sein. Wir haben für die Unterschiedlichkeit dieser Werte keine Erklärung.

Andererseits finden wir, daß $[Cl]_{ICV}^*$ im Bereich kleiner Cl-Badelösungskonzentrationen im Mittel gleich groß wie diese ist; diese Aussage wird durch die Fehlbestimmung des Inulinraumes nicht beeinträchtigt. Die tatsächlichen Werte von $[Cl]_{ICV}^*$ sind in Wirklichkeit höchstens etwas größer als aus Abb. 23 hervorgeht, da die Cl_2 -Entwicklung beim Auflösen der Haut zu einem Verlust an Aktivität geführt hat, über dessen Größe wir allerdings keine Anhaltspunkte haben.

Die gemessenen Cl-Zellinnenkonzentrationen erhielten wir durch epithel- und koriumseitigen Austausch mit ^{36}Cl ; wir haben keine Messungen durchgeführt, mit deren Hilfe eine Aufteilung des Gesamtbetrages an $[Cl]_{ICV}^*$ in einzelne Cl-Pools, insbesondere in den Cl-Transport-Pool, möglich gewesen wäre: deshalb können wir aus den Absolutwerten von $[Cl]_{ICV}^*$ keine Anhaltspunkte für ein Cl-Transportmodell ableiten; wenn wir aber annehmen, daß außer dem Cl-Transport-Pool alle übrigen Cl-Pools im Bereich $Cl = 0 - 85 \text{ meq/l}$ linear mit der Cl-Konzentration zunehmen, so würde aus Abb. 23 folgen, daß der Transport-Pool mit steigender Badelösungskonzentration abnimmt: daraus würde folgen, daß der konzentrationslimitierte und möglicherweise aktive Schritt auf der epithelseitigen Membran lokalisiert ist. Die Aussage der Abb. 24 steht zu dieser Schlußfolgerung nicht im Widerspruch.

Die Befunde, daß der Cl-Fluß bei einseitiger Cl-Konzentrationserhöhung auf der Koriumseite konstant bleibt auch bei beidseitiger Konzentrationszunahme abnimmt, lassen ebenfalls den Schluß zu, daß der konzentrationslimitierte Schritt auf der epithelseitigen Membran liegt.

Die Versuche, durch einseitige Abkühlung der Epithel- oder Koriumseite der Haut unterschiedliche Hemmungen des Cl-Flusses zu finden, um daraus auf die Lokalisation des temperatur-empfindlicheren d. h. aktiven Transportschrittes zu schließen, brachten keinen Erfolg.

Die Froshhaut gehört somit zu den Epithelien, die einen aktiven Na- und einen aktiven Cl-Transport besitzen.

Unter Kurzschlußbedingungen werden pro Zeiteinheit bei NaCl-Konzentration normaler Ringerlösung etwa zehnmal mehr Na- als Cl-Ionen aktiv und unabhängig voneinander transportiert. Die Größe der jeweiligen Pumpleistungen ist von der Art und der Konzentration der in Lösung befindlichen Ionen abhängig.

Unter Leerlaufbedingungen kann der aktive Na-Influx prinzipiell von allen gelösten Anionen in gleicher bzw. Kationen in entgegengesetzter Richtung begleitet sein, und zwar derart, daß zu jeder Zeit die Summe aller Ionenflüsse durch jede Flächeneinheit der Haut gleich Null ist; das gilt analog auch für den aktiven Cl-Influx. Die Beteiligung all dieser, durch den aktiven Transport zur Währung der Elektroneutralität induzierten, passiven Ionenflüsse am Gesamtfluß hängt von der Permeabilität der einzelnen Ionen ab.

In vivo kann infolge der Unabhängigkeit der Na- und Cl-Pumpen, je nach ihrer Aktivierung, ein bestimmtes Ionendefizit der interstitiellen Flüssigkeit besser behoben werden, als wenn nur eine Pumpe existieren würde. Daß diese Unabhängigkeit in vivo vorliegt, zeigen z. B. die Ergebnisse von Krogh (1937), Huf und Wills (1951) und Garcia-Romeu (1969).

Allerdings zeigen alle anderen und unsere eigenen in vitro Untersuchungen über den aktiven Cl-Transport, daß dieser etwa um eine Größenordnung kleiner ist, als der aktive Na-Transport; wir vermuten aber, daß die Kapazität der Cl-Pumpe in vivo größer ist, und zwar aus folgendem Grund:

Aus der Konzentrationsabhängigkeit der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse (Abb. 17/Mitte) geht hervor, daß der Cl-Efflux bei der korialen, d. h. interstitiellen Cl-Konzentration von ca.

70 meq/l (Conway, 1957), die normalerweise in vivo vorliegt, mit dem Cl-Influx bei der epithelialen Cl-Konzentration von 20 meq/l im Gleichgewicht steht, d. h. $\phi_{31} (70/105) \approx \phi_{13} (20/105)$. Nach den in vitro Messungen kann also der Cl-Transport unter diesen Bedingungen nur ein Konzentrationsverhältnis von 1 : 3.5 überwinden.

Die Cl-Konzentrationen des äußeren Milieus, in dem der Frosch lebt, sind aber sicher nicht größer als 1 meq/l, d. h. in vivo muß mindestens ein Verhältnis von 1 : 70 überwunden werden. Der solvent drag von Cl durch den osmotischen Wasser-Influx und die (kleinen) transepithelialen Potentialdifferenzen kommen zur Überwindung dieses restlichen Gradienten sicher nicht in Frage.

Wenn also der Frosch zu einer vom Na-Transport unabhängigen Netto-Cl-Resorption fähig ist, muß die Pumpe in vivo eine größere Leistung besitzen, als dies in vitro meßbar ist; wir vermuten, daß dies auf das Fehlen einer nervösen oder humoralen Regulation zurückzuführen ist; möglicherweise existiert in vivo infolge des vom Blut ständig transportierten CO_2 auf der Blutseite an irgendeiner Zellmembran ein HCO_3^- -Cl-Austausch, der die Cl-Resorption nennenswert vergrößert im Vergleich zu den in vitro Verhältnissen, in denen weder Bikarbonat noch CO_2 auf der Koriumseite angeboten werden.

Von den Epithelien, die einen aktiven Na- und Cl-Transport besitzen, zeichnet sich z. B. die Gallenblase dadurch aus, daß der aktive Transport eines Na-Ions direkt und obligatorisch mit dem aktiven Transport eines Cl-Ions gekoppelt ist, Martin und Diamond (1966); bei der Untersuchung der Energetik dieses Transportes fanden die Autoren, daß pro Mol Sauerstoff an der Gallenblase ungefähr doppelt so viele Ionen aktiv transportiert werden (50 Mol Ionen = 25 Na + 25 Cl/Mol O_2), als z.B. an der Froschhaut (16 - 20 Na/Mol O_2 , Zerahn, 1956) oder an der Krötenblase (19 Na/Mol O_2 , Leaf und Dempsey, 1960), an denen überwiegend die Na-Pumpe in Erscheinung tritt; da aber an diesen beiden Epithelien pro aktiv transportiertes Na auch ungefähr ein Cl mitgenommen wird, ist der O_2 -Verbrauch pro NaCl an der Gallenblase etwa gleich dem an der Froschhaut bzw. Krötenblase.

Wenn es also ähnlich viel Energie kostet, entweder mit nur einer Na- oder mit einer Na- und einer Cl-Pumpe NaCl durch das Epithel gegen einen Gradienten ins Interstitium zu transportieren, so liegt der Vorteil der zweiten Möglichkeit darin, daß der betreffende Organismus oder das betreffende Organ von der Elektrolytzusammensetzung des Raumes unabhängiger ist, von dem aus diese Resorption stattfindet.

Aus den Formulierungen der irreversiblen Thermodynamik (Kedem, 1961) ergibt sich, daß ein Teilchenfluß ϕ_i prinzipiell drei verschiedene Ursachen haben kann: 1. das Vorliegen eines elektrochemischen Gradienten $\Delta\mu_i$, 2. seine Wechselwirkung mit anderen Flüssen ϕ_j , die simultan an dem gleichen System existieren und 3. die Kopplung mit einer chemischen Reaktion ϕ_r :

$$\phi_i^N = \frac{-1}{R_{ii}} (\Delta\mu_i + \sum_{j \neq i} R_{ij} \phi_j + R_{ir} \phi_r).$$

Die Größen R_{ii} , R_{ij} und R_{ir} sind linear dimensioniert nach Widerständen entsprechen, bilden die symmetrische Matrix der linearen Beziehungen zwischen Teilchenflüssen ϕ_i und Kräften X_k :

$$\phi_i = \sum_K L_{iK} X_K.$$

Den Beweis, daß an der Froschhaut ein aktiver Cl-Transport existiert, erbrachten wir, indem bei fehlendem elektrochemischen Potentialunterschied ($\Delta\mu_{Cl} = 0$) ein Netto-Cl-Transport ϕ_{Cl}^N nachgewiesen wurde, ohne daß dafür eine Kopplung mit anderen Flüssen verantwortlich gemacht werden könnte, d. h. R_{Clj} bzw. $\phi_j \approx 0$ ($j = Ca, K, H, Cholin, OH, SO_4$).

Der aus unidirektionalen Cl-Flüssen errechnete Netto-Cl-Influx ist also nur durch seine Wechselwirkung mit einer chemischen Reaktion zu erklären und somit per definitionem als aktiver Transport zu interpretieren.

E Berechnungen

E I Kammervolumenbestimmung nach der Verdünnungsmethode

Während der einzelnen Phasen werden zwar den beiden Kammerhälften zu gleichen Zeitpunkten gleich große Samplevolumina entnommen, doch kommt es vor, daß sich die beiden Kammervolumina nach einiger Zeit scheinbar oder tatsächlich voneinander unterscheiden. Dies kann z. B. daran liegen, daß durch unterschiedlich starkes Schäumen ein unterschiedlich starker Flüssigkeitsverlust einsetzt, je nachdem, ob es sich um die korium- oder die epithelseitige Lösung handelt, oder daß nach dem Spülen der Kammer ein unterschiedlich großes Volumen in der Kammer zurückbleibt, bevor ein Volumen definierter Größe eingefüllt wird; oder daß sich infolge verschieden starker O_2 -Belüftung unterschiedlich viel Flüssigkeit in den Schläuchen befindet, oder sich die Haut infolge unterschiedlicher Sogwirkung durchbeult. Für diese Fälle, in denen die tatsächliche Größe des Volumens während einer Meßphase unsicher ist, muß man die Möglichkeit besitzen, die beiden Kammervolumina genauer zu bestimmen als dies -wie sonst- rein visuell an den graduierten Gefäßen (6, Abb. 1) möglich ist.

Dazu verwendeten wir die Verdünnungsmethode:

Die Testsubstanz (Isotop oder Farbstoff) des zu bestimmenden Volumens V_0 mit der Ausgangskonzentration c_0 wird zu bestimmten Zeiten mit je einem wässrigen Volumen der Größe V (z. B. 1 ml) verdünnt und zu den Zeiten t_1 Samples (Volumen v) zur Messung ihrer Konzentration c_1 (t_1) entnommen. Unter der Voraussetzung, daß nach erfolgter Verdünnung der beiden Kammervolumina keine Testsubstanz aus der Haut oder aus toten Winkeln der Kammer ausgewaschen werden, gelten folgende Gleichungen:

	+ V		- v + V		- v + V	usw.
$V_0 = V_0$		$V_1 = V_0 + V$		$V_2 = V_0 + 2V - v$		

$$I. \quad c_0 V_0 = c_1 (V_0 + V)$$

$$II. \quad c_1 (V_0 + V) = c_2 (V_0 + 2V - v) + c_1 v$$

$$III. \quad c_2 (V_0 + 2V - v) = c_3 (V_0 + 3V - 2v) + c_2 v$$

usw.

Nach der i -ten Verdünnung ergibt sich das gesuchte Volumen V_0 zu

$$V_0 = \frac{ic_1 V - (i-1)c_{i-1} V + (i-1)(c_{i-1} - c_1)v}{c_{i-1} - c_1}$$

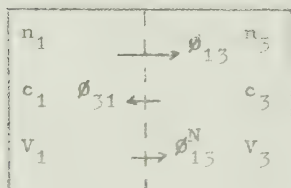
Wir berechnen die Volumina V_0 für Epithel- und Koriumseife aus den Aktivität $\bar{c}_i$ nach 3 - 4 Verdünnungen und errechnen daraus das arithmetische Mittel $\bar{V}_0$.

E II Berechnung von θ und P

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen haben wir PAH- und Cl-Flüsse an der Froschhaut und zur Bestimmung der Aktivierungsenergie in wässriger Phase die Diffusion dieser beiden Teilchen durch die Satorius-Filtermembranen gemessen. Die Permeabilitäten des Epithels sind um 2 - 3 Größenordnungen kleiner als die der künstlichen Membran: bei ersteren Untersuchungen ist die Meßdauer der einzelnen Phasen ($T = 10$ min.) sehr klein gegenüber der Halbwertszeit $t_{1/2}$, in der durch Stofftransport der anfänglich vorhandene Konzentrationsunterschied Δc auf die Hälfte abgenommen hat. Im Unterschied dazu gilt bei den Untersuchungen an der Filtermembranen etwa $T \approx t_{1/2}$ deshalb erfolgt die Permeabilitäts- bzw. Flußbestimmung am Epithel unter quasi-stationären, die an der künstlichen Membran unter nichtstationären Verhältnissen. Erstere können als Grenzfälle der letzteren verstanden werden.

1) nichtstationäre Verhältnisse

Betrachtet wird die Diffusion durch eine isotrope "Membran" mit der Fläche F ($P_{13} = P_{31} = P$), die zwei Flüssigkeitsräume 1 und 3 voneinander trennt; außerdem sei ihre Permeabilität für PAH und Cl so groß, daß während der Meßzeit T der Diffusionsfluß infolge der Abnahme des Konzentrationsgradienten kleiner wird.



$$c_1 > c_3$$

$$c_1 - c_3 = \Delta c$$

$\Delta c \approx 0$ bei Verwendung von Isotopen

n_1, n_3 Molzahlen des betrachteten Teilchens

c_1, c_3 Konzentrationen des betrachteten Teilchens

N_1, N_3 Flüssigkeitsvolumina

Fick'sches Gesetz:

$$\frac{dn}{dt} = -FP\Delta c$$

$$I \quad \frac{dn_1}{dt} = -FP(c_1 - c_3)$$

$$II \quad \frac{dn_3}{dt} = +FP(c_1 - c_3)$$

$$III \quad n = cV$$

$$IV \quad \begin{cases} t = 0 \\ t = t \end{cases} \quad \begin{cases} n_1 = n_1^0 \\ n_3 = n_3^0 \\ n_1 = n_1^0 - n_3 \\ n_3 = n_3 \end{cases}$$

Nach Zusammenfassung von I, II, III ergeben sich zwei Differentialgleichungen für $c_1(t)$ und $c_3(t)$:

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = FP \frac{c_1(0)}{V_3} - FP \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_3} \right) c_3(t) \quad (1)$$

$$\frac{dc_3(t)}{dt} = FP \frac{c_1(0)}{V_3} - FP \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_3} \right) c_3(t) \quad (2)$$

Als Lösung ergeben sich nach der Berücksichtigung der Anfangsbedingungen IV und unter der Voraussetzung, daß P eine Konstante ist (also nicht von c abhängt) folgende Ausdrücke für $c_1(t)$ und $c_3(t)$:

$$c_1(t) = c_1(0) - \frac{c_1(0)V_1}{V_1 + V_3} \exp \left[-FP \frac{V_1 + V_3}{V_1 V_3} t \right] + \frac{c_1(0)V_1}{V_1 + V_3} \quad (3)$$

$$c_3(t) = \frac{c_1(0)V_1}{V_1 + V_3} \left[1 - \exp \left(-FP \frac{V_1 + V_3}{V_1 V_3} t \right) \right] \quad (4)$$

Daraus folgen für $t = 0$ und $t \rightarrow \infty$ die plausiblen Ergebnisse:

$$c_1(0) = c_1(0)$$

$$c_3(0) = 0$$

$$c_1(t \rightarrow \infty) = \frac{c_1(0)V_1}{V_1 + V_3}$$

$$c_1(\infty) = c_3(\infty)$$

$$c_3(t \rightarrow \infty) = \frac{c_1(0)V_1}{V_1 + V_3}$$

Gilt speziell -wie in unseren Versuchen- $V_1 = V_3 = V$, so ergeben sich für $c_1(t)$, $c_3(t)$ folgende Gleichungen:

$$c_1(t) = \frac{c_1(0)}{2} \left[1 + \exp \left(-\frac{2FP}{V} t \right) \right] \quad (5)$$

$$c_3(t) = \frac{c_1(0)}{2} \left[1 - \exp \left(-\frac{2FP}{V} t \right) \right] \quad (6)$$

Aus der logarithmischen Auftragung $\log c_i(t) \rightarrow t$ von den Gleichungen (3), (4), bzw. (5), (6) ergibt sich die Permeabilität P. Der zeitliche Verlauf der Teilchenflüsse ergibt sich zu:

$$\dot{Q}_i(t) = P \cdot c_i(t) \quad i = 1, 3$$

2) quasi-stationäre Verhältnisse

Nach den Gleichungen (5), (6) ergibt sich mit Hilfe der angenähert errechneten Cl- bzw. PAH-Permeabilitäten an der Froschhaut von ca. $5 \cdot 10^{-6}$ bzw. $0.5 \cdot 10^{-6}$ cm/sec eine Halb-

wertszeit $t_{1/2}$ von 20 bzw. 200 Stunden; d. h. es gilt:
 $\frac{2FP}{V} T \ll 1$ und die Gleichungen (5), (6) können angenähert
 werden:

$$c_1(t) = \frac{c_1(0)}{2} \left(1 + 1 - \frac{2FP}{V} t + - \dots \right) \\ \approx c_1(0) \left(1 - \frac{2FP}{V} t \right) \quad (7)$$

$$c_3(t) = \frac{c_1(0)}{2} \left(1 - 1 + \frac{2FP}{V} t + - \dots \right) \\ \approx \frac{c_1(0) FP}{V} t \quad (8)$$

Diese Beziehungen (7), (8) gehen aus den Fick'schen Gleichungen hervor, wenn sie unter der Annahme $\Delta c \neq \Delta c(t)$ integriert werden.

Aus (8) folgt

$$P = \frac{V}{F} \cdot \frac{\Delta c_3(t)}{\Delta t} \cdot \frac{1}{c_1(0)} = \text{konst.} \quad (9)$$

Daraus errechnet sich der Fluß

$$\phi = P \cdot c_1(0) = \frac{V}{F} \cdot \frac{\Delta c_3(t)}{\Delta t} = \text{konst.} \quad (10)$$

Im Gegensatz zu Gleichung (9), in der die Berechnung von P nur sinnvoll ist, wenn sie konzentrationsunabhängig ist, gilt Gleichung (10) generell; sie geht direkt aus der Definition eines Teilchenflusses hervor:

$$\phi = \frac{1}{F} \frac{dn}{dt} \quad (11)$$

Alle Cl- und etwa die Hälfte der PAH-Flüsse ermitteln wir aus Tracermessungen. Die Berechnung der zeitlichen Konzentrationszunahme ($\Delta c/\Delta t$) aus der Aktivitätszunahme $\Delta c^*/\Delta t$ erfolgt über die Größe der spezifischen Aktivität $a^* = c^*/c$

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{1}{a^*} \cdot \frac{\Delta c^*}{\Delta t}$$

E III Berechnung der Aktivierungsenergie

Die Temperaturabhängigkeit der Selbst- und Fremddiffusion in gasförmiger, flüssiger und fester Phase wird mit Hilfe des Boltzmannfaktors beschrieben. Dem liegt die Vorstellung zugrunde, daß das Teilchen auf einem Diffusionsweg Potentialschwellen, oder sog. Aktivierungsenergien der mittleren Höhe ϵ überwinden muß, die von seinem Nachbarn gebildet werden. Von N_0 Teilchen mit der mittleren thermischen Energie kT besitzen nur $N_0 \cdot \exp(-\epsilon/kT)$ Teilchen eine Energie, die größer als ϵ ist; diese Zahl ist das Maß für die erfolgreichen Diffusionsschritte pro Zeit, also für den Teilchenfluß.

Die Diffusion eines Teilchens durch eine strukturell kompliziert aufgebaute "Membran" wie der Froschhaut, kann nicht allein durch Wechselwirkung dieses Teilchens mit flüssigen und/oder "festen" Strukturen des Epithels beschrieben werden. Als weitere Charakterisierung des Transportweges kommen vor allem z. B. chemische Reaktionen in Frage. In der Deutung der Reaktionsgeschwindigkeit auf Grund der Stoßtheorie spielt aber wiederum -aus ähnlichen Überlegungen wie oben- der Boltzmann-Faktor eine Rolle; trotz dieser Erweiterung kann also die Temperaturabhängigkeit eines Teilchentransportes innerhalb eines bestimmten Temperaturintervalls durch eine oder auch möglicherweise mehrere Aktivierungsenergien charakterisiert werden. Infolge der Vielfalt der Prozesse, die an der pauschalen Temperaturabhängigkeit beteiligt sind, ist es nur in ganz speziellen Fällen möglich, von der gemessenen Aktivierungsenergie $E = L \cdot \epsilon$ (L = Loschmidt'sche Zahl) auf einen bestimmten Diffusionsmechanismus (z. B. Diffusion in rein wässriger oder in reiner Lipidphase) zu schließen. So ist für uns die Größe E nur im Vergleich mit dem unter anderen Bedingungen gemessenen Wert interessant.

Wir nehmen an:

$$\phi(T) = \phi(T_0) \cdot \exp(-\epsilon/kT) = \phi(T_0) \cdot \exp(-E/RT)$$

$$\ln \phi(T) = \ln \phi(T_0) - \frac{E}{RT}$$

$$- R \frac{d \ln \phi}{d(1/T)} = E$$

Trägt man also von der gefundenen Temperaturabhängigkeit $\varnothing(T)$ in $\varnothing(T)$ gegen $1/T$ auf und erhält einen linearen Zusammenhang, so ist das Produkt aus der Steigung dieser Geraden mit der Gaskonstanten R gleich der Aktivierungsenergie.

Wenn in einem bestimmten Temperaturintervall eine definierte Energie gefunden wird, so bedeutet das, daß in diesem Bereich entweder ein bestimmter Prozeß gegenüber allen anderen dominiert, oder daß die gefundene Energie die Summe von Einzelenergien mehrerer Prozesse ist, die simultan zur Temperaturabhängigkeit beitragen.

E IV Bestimmung der wahren ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten aus den Impulsraten zweier Zählkanäle

Zur Aktivitätsmessung mehrerer Isotope in einem Sample steht uns gewöhnlich ein Counter mit höchstens 3 Zählkanälen zur Verfügung. Wir wollen zunächst die Methode angeben, nach der die wahren Aktivitäten von 3 verschiedenen, in einem Sample enthaltenen Isotopen berechnet werden, um daraus der Spezialfall für zwei Isotope abzuleiten.

Voraussetzung dafür, daß eine Mehrfachdiskriminierung erfolgen kann, ist, daß sich die Energiespektren der Isotope genügend voneinander unterscheiden und in entsprechender Konzentration vorkommen. Die 3 verschiedenen Isotope bezeichnen wir mit 1, 2, 3, die 3 Kanäle mit x, y, z. Für die mittleren Energien E_i der Isotope gelte $E_3 > E_2 > E_1$; Beispiel: 1 = ^3H , 2 = ^{14}C , 3 = ^{36}Cl . Die Aktivitäten c werden mit Subskripten versehen, aus denen hervorgeht, welchem Isotop sie zuzuschreiben sind, und in welchem Kanal sie erfaßt werden; z. B. c_{2z} bedeutet die Aktivität des Isotops 2 im Kanal z. Die Summe der Aktivitäten eines jeden Isotops in allen Kanälen muß gleich sein der Gesamtaktivität dieses Isotops.

Verwendet man verschiedene Proben, in denen je ein Isotop in reiner Form vorliegt, so kann man aus deren Aktivitäten in den 3 Kanälen die Diskriminierungsfaktoren D berechnen. Man erhält folgendes Gleichungssystem mit 9 Unbekannten:

$$\text{I} \quad c_x = c_{1x} + c_{2x} + c_{3x}$$

$$\text{II} \quad c_y = c_{1y} + c_{2y} + c_{3y}$$

$$\text{III} \quad c_z = c_{1z} + c_{2z} + c_{3z}$$

$$\text{IV} \quad \frac{c_{1y}}{c_{1x}} = D_{1yx}$$

$$\text{V} \quad \frac{c_{1z}}{c_{1y}} = D_{1zy}$$

$$\text{VI} \quad \frac{c_{2y}}{c_{2x}} = D_{2yx}$$

$$\text{VII} \quad \frac{c_{2z}}{c_{2y}} = D_{2zy}$$

$$\text{VIII} \quad \frac{c_{3y}}{c_{3x}} = D_{3yx}$$

$$\text{IX} \quad \frac{c_{3z}}{c_{3y}} = D_{3zy}$$

In den für die verschiedenen Kanäle angegebenen Aktivitäten seien die Nulleffekte bereits berücksichtigt.

In diesen Gleichungen werden folgende Umformungen vorgenommen:

$$\text{IV} \quad c_{1y} = D_{1yx} \cdot c_{1x} \quad ; \quad \text{IV} \cdot \text{V} \quad c_{1z} = D_{1yx} \cdot D_{1zy} \cdot c_{1x}$$

$$\text{VI} \quad c_{2y} = D_{2yx} \cdot c_{2x} \quad ; \quad \text{VI} \cdot \text{VII} \quad c_{2z} = D_{2yx} \cdot D_{2zy} \cdot c_{2x}$$

$$\text{VIII} \quad c_{3y} = D_{3yx} \cdot c_{3x} \quad ; \quad \text{VIII} \cdot \text{IX} \quad c_{3z} = D_{3yx} \cdot D_{3zy} \cdot c_{3x}$$

Setzt man die Größen c_{iy} und c_{iz} ($i = 1, 2, 3$) in I - III ein, so erhält man ein lineares Gleichungssystem für c_{ix} . Die Auflösung nach den Größen erfolgt nach der Kramer'schen Regel.

Analog wird mit den Unbekannten c_{iy} und c_{iz} verfahren. Aus den Summen $c_{1x} + c_{1y} + c_{1z} = c_1$ bzw. $c_{2x} + c_{2y} + c_{2z} = c_2$ und $c_{3x} + c_{3y} + c_{3z} = c_3$ erhalten wir dann die wahren Aktivitäten der Isotope 1 bzw. 2 und 3.

Um den oben beschriebenen Weg zu vereinfachen, kann man unter Umständen die Windows der einzelnen Kanäle so wählen, daß $c_{1y} = c_{1z} = c_{2z} = 0$ ist. Daraus folgt: $c_z = c_{3z}$, $D_{1yx} = D_{1zy} = D_{2zy} = 0$; das Gleichungssystem reduziert sich auf 5 Unbekannte; seine Lösungen lauten:

$$c_1 = c_x - c_y \frac{1}{D_{2yx}} - c_z \left[\frac{1}{D_{3zx}} - \frac{1}{D_{2yx} D_{3zy}} \right]$$

$$c_2 = c_y \left[1 + \frac{1}{D_{2yx}} \right] - c_z \left[\frac{1}{D_{3zy}} + \frac{1}{D_{2yx} D_{3zy}} \right]$$

$$c_3 = c_z \left[\frac{1}{D_{3zx}} + \frac{1}{D_{3zy}} + 1 \right]$$

Daraus ergibt sich die Probe

$$c_1 + c_2 + c_3 = c_x + c_y + c_z .$$

Beschränkt man sich auf die Diskriminierung zweier Isotope 1 und 2 in den Kanälen x und y, so ergibt sich

$$c_1 = c_x - c_y \frac{1}{D_{2yx}}$$

$$c_2 = c_y \left[1 + \frac{1}{D_{2yx}} \right] .$$

E V Berechnung von ϕ nach der Methode der direkten Photometrie

Die Berechnung des PAH-Flusses erfolgt nach einer Formel, die eine Kombination des Lambert-Beer schen Gesetzes und der Definitionsgleichung für ϕ darstellt.

$$I \quad \phi = \frac{1}{F} \frac{dn}{dt} = \frac{V}{F} \frac{dc}{dt}$$

$$II \quad \ln \frac{I_0}{I} = 2.3 \quad \epsilon \quad cd$$

$$II \quad \frac{dc}{dt} = \frac{1}{2.3 \epsilon d} \left(- \frac{1}{I} \frac{dI}{dt} \right)$$

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient
 c = Substanzkonzentration
 d = Schichtdicke
 $\frac{I}{I_0}$ = Transmission

$$I, II \quad \emptyset = \frac{V}{F} \frac{1}{2.3 \epsilon d} \left(- \frac{1}{I} \frac{dI}{dt} \right) \quad (1)$$

$$\begin{aligned} V &= 5.7 \text{ cm}^3 \\ F &= 5.34 \text{ cm}^2 \\ d &= 1.0 \text{ cm} \\ \epsilon &= 16 \text{ (mM/l)}^{-1} (\lambda=275\text{nm}) \end{aligned}$$

Ein stationärer Fluß ergibt einen zeitlichen Verlauf von $I(t)$ auf dem Schreiber, der einer e-Funktion entspricht; bei einer PAH-Permeabilität von $3 \cdot 10^{-7}$ cm/sec (s. C I 1) und bei einer Konzentrationsdifferenz von 20 mM/l ändert sich die Lichtintensität bezogen auf I_0 in 10 min. um ca. 10 %; d. h. in solchen und kleineren Zeitintervallen können die Quotienten dI/dt in guter Näherung durch $\Delta I/\Delta t$ und I durch die im Zeitintervall Δt mittlere Intensität $\bar{I}$ ersetzt werden.

Der Fluß kann um so genauer gemessen werden, je größer I bzw. der durch I am Arbeitswiderstand erzeugte Spannungsabfall ist. Die von uns verwendete Anordnung (Abb. 5) läßt bei optimaler optischer Justierung und bei Verwendung einer praktisch PAH-freien Lösung auf der Küvettenseite Meßspannungen von 1000 mV mühelos zu, wobei das Rauschen im Betriebszustand der Anordnung ca. 5 % ausmacht. Auf diese Weise können PAH-Flüsse bei Konzentrationsdifferenzen von mindestens 2 mM/l gemessen werden.

Die Konstruktion der Küvettenhalterung läßt mit Hilfe zweier (gekreuzter) Strahlengänge prinzipiell auch die simultane Flußmessung zweier Teilchen nach der Methode der direkten Photometrie zu. Voraussetzungen dafür sind, daß 1. die Absorptionsspektren der beiden Teilchen nicht zu ähnlich sind, 2. die beiden Teilchen im untersuchten Konzentrationsbereich nicht in Wechselwirkung miteinander stehen, d. h. daß die Gesamtextinktion gleich der Summe der Einzelextinktionen ist, und 3. bei der betreffenden Wellenlänge keine weiteren Substanzen absorbieren. Für PAH und Diodrast ist nach Abb. 9 die 1. Voraussetzung in gewissen Grenzen erfüllt. Für sehr kleine Konzentrationen $c \leq 0,1$ mM/l ist die 2. Voraussetzung sehr gut erfüllt, bei $c = 5$ mM/l nicht mehr. Nach dem in B III 4 gesagten ist die letzte Voraussetzung mit Einschränkungen erfüllt, je nachdem, in welchem Wellenlängenbereich gemessen wird.

Die simultane Bestimmung zweier Substanzen in einer Lösung erfolgt durch die Extinktionsmessung bei zwei verschiedenen Wellenlängen, bei denen sich die Extinktionen maximal voneinander unterscheiden sollten. Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten ϵ von PAH zu Diodrast ist bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon_{1D}/\epsilon_{1P}$) = 1.9 und bei $\lambda_2 = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon_{2D}/\epsilon_{2P}$) = 0.14.

Es gelten die Gleichungen:

$$\begin{array}{ll} \text{I} & E_1 = \epsilon_{1D} c_D + \epsilon_{1P} c_P \\ \text{II} & E_2 = \epsilon_{2D} c_D + \epsilon_{2P} c_P \end{array} \quad \begin{array}{l} E_1 = E(\lambda_1) \\ E_2 = E(\lambda_2) \\ c_D = \text{Diodrast-} \\ c_P = \text{PAH-} \end{array} \quad \begin{array}{l} \\ \\ \text{Konzentration} \end{array}$$

Daraus ergeben sich die Lösungen:

$$\frac{dc_P}{dt} = \frac{1}{\Delta} \left[\epsilon_{1D} \left(-\frac{1}{I_1} \cdot \frac{dI_1}{dt} \right) - \epsilon_{2D} \left(-\frac{1}{I_2} \cdot \frac{dI_2}{dt} \right) \right] \quad (2)$$

$$\frac{dc_D}{dt} = \frac{1}{\Delta} \left[\epsilon_{2P} \left(-\frac{1}{I_1} \cdot \frac{dI_1}{dt} \right) - \epsilon_{1P} \left(-\frac{1}{I_2} \cdot \frac{dI_2}{dt} \right) \right] \quad (3)$$

$$\Delta = (\epsilon_{1D} \epsilon_{2D} - \epsilon_{1P} \epsilon_{2D})$$

Aus dem zeitlichen Intensitätsverlauf der beiden monochromatischen Strahlen I_1 und I_2 können somit die PAH- bzw. Diodrastflüsse errechnet werden.

F Zusammenfassung

In einer modifizierten Ussing-Kammer haben wir den Cl- und p-Aminohippursäure (PAH)-Transport an der Haut von *R. esculenta* untersucht; dazu wurden die unidirektionalen chemischen Cl- und ein Teil der PAH-Flüsse aus den ^{36}Cl - und ^3H -PAH-Isotopenflüssen ermittelt. Zur Messung der restlichen PAH-Flüsse haben wir eine Methode entwickelt, in der die zeitliche PAH-Konzentrationsänderung in einer Kammerhälfte fortlaufend durch direkte Photometrie der Kammerlösungen erfolgte.

Die Netto-Cl- bzw. PAH-Flüsse werden aus der Differenz der beiden unidirektionalen Cl- bzw. PAH-Flüsse berechnet. Alle Flußmessungen, außer denen, die nach der Methode der direkten Photometrie unter Vorgeben eines chemischen Gradienten ermittelt wurden, führten wir bei fehlendem elektrischen und chemischen Gradienten durch; bei den Lösungen unterschiedlicher Cl- bzw. Na-Konzentration wurde Cl durch SO_4 bzw. Na durch Cholin ersetzt.

Wir fanden folgende Ergebnisse:

1. Im Bereich der Cl-Konzentration zwischen 0 und 83 meq/l existiert ein, vom aktiven Na-Transport unabhängiger, aktiver Cl-Transport, der von der Epithel- zur Koriumseite orientiert ist; seine Abhängigkeit von der Cl-Konzentration hat Ähnlichkeit mit einer Sättigungskinetik; bei Cl-Konzentrationen um 100 meq/l dürfte er seinen Maximalwert erreicht haben; bei 83 meq/l beträgt er $3.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; im Bereich kleiner Cl-Konzentrationen steigt er linear bis mindestens 2.5 meq/l an und beträgt dort im Mittel $1.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Bei hohen Cl-Konzentrationen macht er im Mittel ca. 10 % des Na-Transportes aus, der in normaler Ringerlösung im Mittel gemessen wird.
2. Die Cl-Konzentrationsabhängigkeiten der beiden unidirektionalen Cl-Flüsse zeigen in der Minderheit der Fälle reine Proportional- oder Sättigungskinetiken, in der Mehrheit aber Kombinationen dieser beiden. Dem Cl-Efflux bei Cl = 83 meq/l entspricht näherungsweise eine Permeabilität von $80 \cdot 10^{-7}$ cm/sec. Die Cl-In- und -Effluxes bestehen aus mindestens zwei

Einzelkomponenten: diejenige mit der Proportionalkinetik ist wahrscheinlich beiden unidirektionalen Flüssen gemeinsam; die Komponenten mit der Sättigungskinetik unterscheiden sich voneinander durch ihren Maximalfluß ($\phi_{\max 13} > \phi_{\max 31}$) und wahrscheinlich auch durch ihre Halbsättigungskonzentration ($K_{m13} < K_{m31}$).

3. Bei Übergang von Na-haltigen zu Na-freien Lösungen ($\text{Cl} = 83 \text{ meq/l}$) nimmt der Netto-Cl-Fluß um ca. 60 % ab und beträgt ca. $1.3 \mu\text{A/cm}^2$. In Na-freien Lösungen wird ein mittlerer negativer Kurzschlußstrom von gleicher Größe gefunden; dieser Strom repräsentiert den Netto-Cl-Influx, da keine weiteren transepithelialen Ionentransporte an der Froschhaut zur Diskussion stehen. Die an der Haut von *R. pipiens* gefundene Azidifizierung der Epithel- und die Alkalinisierung der Koriumseite, die einem negativen Kurzschlußstrom von $1 \mu\text{A/cm}^2$ entsprechen (Emilio et al. 1970), sind an der Haut von *R. esculenta*, zumindest unter unseren Versuchsbedingungen nicht nachweisbar und bilden folglich auch keinen Beitrag zum Kurzschlußstrom.
4. Bei Übergang von Cl-haltigen zu Cl-freien Lösungen ($\text{Na} = 105 \text{ meq/l}$) nimmt der dem Na-Transport entsprechende positive SCC um ca. 50 % ab.
5. Anhand der Messungen von austauschbaren Cl-Zellinnenkonzentrationen erhielten wir einen Anhaltspunkt dafür, daß der konzentrationslimitierte Schritt des Cl-Transportes an der epithelseitigen Membran lokalisiert sein könnte.
6. Aus in vivo Experimenten geht hervor, daß die Haut von *R. esculenta* zu einer aktiven Cl-Resorption fähig ist. Da der gefundene Cl-Transport in vitro nur etwa 10 % des aktiven Na-Transportes ausmacht und so klein ist, daß er das in vivo vorliegende Cl-Konzentrationsverhältnis von etwa 1: 100 (außen : innen) nicht überwinden kann, nehmen wir an, daß er durch das Fehlen einer nervösen oder humoralen Regulation um ca. eine Größenordnung reduziert wird.

7. Wenigstens im Bereich sehr kleiner PAH-Konzentrationen zwischen 0 und 0.5 meq/l finden wir einen Netto-PAH-Efflux, der bei 0.5 meq/l einem Strom von $0.02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ entspricht.
8. Die PAH-Konzentrationsabhängigkeiten der beiden PAH-Flüsse sind näherungsweise lineare Korrelationen, denen im Mittel eine PAH-Permeabilität von $3 \times 10^{-7} \text{cm}/\text{sec.}$ entspricht.
9. Alle unidirektionalen PAH-Flüsse bei 0.5 bzw. 20 meq/l stehen in keiner erkennbaren Beziehung zu den simultan gemessenen Cl-Flüssen bei 0.5 bzw. 85 meq/l. Deshalb kann eine Wechselwirkung zwischen aktivem Cl-Influx und dem gefundenen Netto-PAH-Efflux ausgeschlossen werden.
Zwischen PAH- und Cl-Flüssen werden keine Gemeinsamkeiten gefunden; sie unterscheiden sich voneinander in der Größe und Richtung ihres Netto-Transportes, in ihrer Abhängigkeit von der PAH- bzw. Cl-Konzentration, der Temperatur, der angelegten Spannung, der Leitfähigkeit des Epithels.
10. Die Befunde über den Cl- und PAH-Transport zeigen, daß zwischen der Froschhaut und den resorbierenden Epithelien der Niere weitere Analogien bestehen.

G Literatur

Aceves, J., D. Erlij (1971)

Na transport across the isolated epithelium of the frog skin.

J. Physiol. 212, 211

Bratton, A. C., E. K. Marshall (1939)

A new coupling component for sulfanilamide determination.

J. biol. Chem. 128, 537

Brdicka, R., (1965)

Grundlagen der physikalischen Chemie.

Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1965,

Tab. 42, S. 278

Burg, M., 1972

Function of the thick ascending limb of Henle's loop.

International Congress of Nephrology, Mexico 1972

Abstracts of plenary sessions and symposia, p. 45

Candia, O. A., (1970)

The hyperpolarizing region of the current-voltage curve in frog skin.

Biophys. J. 10, 323

Conway, E.J., (1957)

The nature and significance of concentration relation of potassium and sodium in skeletal muscle.

Physiol. Rev. 37, 84

Deetjen, P., H. Sonnenberg, (1965)

Der tubuläre Transport von p-Aminohippursäure. Mikro-perfusionsversuche am Einzelnephron der Rattenmiere in situ.

Pflüg. Arch. ges. Physiol. 285, 35

Dörge, A., (1972)

Persönliche Mitteilung

Du Bois-Reymond, E., (1848)

Untersuchungen über tierische Elektrizität

Berlin

- Durbin, R. P., (1964)
Anion requirements for gastric acid secretion.
J. Gen. Physiol. 47, 735
- Emilió, M. G., M. M. Machado, H.P. Menano, (1970)
The production of a hydrogen ion gradient across the
isolated frog skin. Quantitative aspects and the effect
of acetazolamide.
BBA, 203, 394
- Erlj, D., (1971)
Salt transport across isolated frog skin.
Phil. Trans. Roy. London, Serie B, 262, 163
- Ferreira, K.T.G., (1968)
Anionic dependence of sodiumtransport in the frog skin.
BBA, 150, 587
- Finkelstein, A., (1961)
Electical excitability of isolated frog skin.
Nature, 190, 1119
- Finn, A. L., J. S. Handler, J. Orloff, (1967)
Active Cl-Transport in the isolated toad bladder.
Am. J. Physiol. 213/1, 179
- Fischbarg, J., J. A. Zadunaisky, F. W. DeFisch, (1967)
Dependence of sodium and chloride transports on
chloride concentration in isolated frog skin.
Am. J. Physiol. 213/4, 963
- Fleming, . R., (1957)
The role of hydrogen ion and potassium ion in the active
transport of sodium across the isolated frog skin.
J. Cell. Comp. Physiol. 49, 129
- Friedman, R. T., N. S. LaPrade, R. M. Ayawar, E. G. Huf, (1967)
Chemical basis for the H^+ -gradient across frog skin.
Am. J. Physiol. 212/5, 962

- Funder, J., H. H. Ussing, J. O. Wieth, (1967)
The effects of CO_2 and hydrogen ions on active Na
transport in the isolated frog skin.
Acta physiol. Scand. 71, 65
- Garcia-Romeu, F., A. Salibian, S. Pezzani-Hernandez, (1969)
The nature of the in vivo Na and Cl uptake mechanism
through the epithelium of the chilean frog *calyptocephalella*
gayi.
J. Gen. Physiol. 53, 816
- Garcia-Romeu, F., (1971)
Anionic and cationic exchange mechanism in skin of anurans,
with special reference to *Leptodactylidae* in vivo.
Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B 262, 163
- Goldman, D. E., (1943/44)
Potential, impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol. 27, 37
- Green, K., J. E. Pederson, (1972)
Effects of temperature on water flow through the
ciliary epithelium.
Am. J. Physiol. 222/5, 1227
- Huf, E. G., J. Wills, (1951)
Influence of some inorganic cations on active salt
and water uptake by isolated frog skin.
Am. J. Physiol. 167, 255
- Huf, E. G., (1972)
The role of Cl^- and other anions in active Na^+
transport in isolated frog skin.
Acta physiol. Scand. 84, 366
- Jacquez, J. A., J. H. Sherman, J. Tennis, (1970)
Temperature dependence of amino acid transport in
Ehrlich ascites cells: with results which bear on the
A-L-distinction.
BBA, 203, 150

- Jørgensen, C. B., H. Levi, K. Zerahn, (1954)
On active uptake of Na^+ and Cl^- ions in anurans.
Acta physiol. Scand. 30, 178
- Kedem, O. (1961)
Criteria of active transport
In "Membrane Transport and Metabolism" (A. Kleinzeller,
A. Kotyk, eds.)
p. 87-93 Academic Press, New York.
- Kirschner, L. B., (1960)
Permeability of frog skin to Choline
Science 132, 85
- Koefoed-Johnsen, V., H. Levi, H. H. Ussing, (1952)
The mode of passage of Cl^- through isolated frog skin.
Acta physiol. Scand. 25, 150
- Koefoed-Johnsen, V., H. H. Ussing, (1958)
The nature of the frog skin potential.
Acta physiol. Scand. 42, 298
- Kristensen, P., (1972)
Chloride transport across isolated frog skin.
Acta physiol. Scand. 84, 338
- Krogh, A., (1937).
Osmotic regulation of the frog (*R. esculenta*) by active
absorption of chloride ions.
Acta physiol. Scand. 76, 60
- Leaf, A., E. Dempsey, (1960)
Some effects of mammalian neurohypophyseal hormones
on metabolism and active transport of sodium by the
isolated toad bladder.
J. Biol. Chem. 235, 2160
- Leaf, A., (1965)
Transepithelial transport and its hormonal control
in toad bladder.
Rev. Physiol. 56,
- Levi, H., H. H. Ussing, (1949)
The exchange of sodium and chloride ions across the
fibre membrane of the isolated frog sartorius.
Acta physiol. Scand. 16, 232

- Lindemann, B., (1970)
Electrical excitation of the outer resistive membrane
in frog skin epithelium.
Electrophysiology of Epithelia Cells, Symposium:
Schloß Reinhartshausen/Rhein, S. 53
- Linderholm, H., (1954)
On the behavior of the "Sodium Pump" in frog skin at
various concentrations of Na ions in the solution on
the epithelial side.
Acta physiol. Scand. 31, 36
- Macey, R. I., S. Meyers, (1963)
Dependence of Cl permeability on sodium in the
isolated frog skin.
Am. J. Physiol. 204/6, 1095
- Mandel, L. J., P. F. Curran, (1972)
Response of the frog skin to steady-state voltage clamping.
I. The shunt pathway.
J. Gen. Physiol. 59, 505
- Martin, D. W., (1964)
Reversed potentials of isolated frog skin.
J. Cellular Comp. Physiol. 63, 245
- Martin, D. W., J. M. Diamond, (1966)
Energetics of coupled active transport of sodium and chlorides
J. Gen. Physiol. 50, 295
- Martin, D. W., P. F. Curran, (1967)
Reversed potentials of isolated frog skin.
II. Active transport of chloride.
J. Cellular Comp. Physiol. 67, 367
- Nagel, W., A. Dörge, (1970)
Effect of amiloride on Na transport of frog skin.
I. Action on intracellular Na content.
Pflüg. Arch. 317, 84

Netter, H., (1959)

Theoretische Biochemie

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, S. 67

Pesente, L., (1969)

Analisi degli effetti della concentrazione idrogenionica sulla permeazione di alcuni ioni monovalenti attraverso la pelle di rana.

Bol. Soc. Ital. Biol. Sper. 45, 1161

Rector, F. C., J. R. Clapp, (1962)

Evidence for active chloride reabsorption in the renal tubule of the rat.

J. Clin. Invest. 41/1, 101

Sachs, L., (1969)

Statistische Auswertungsmethoden

Springer Verlag, 2. Auflage, S. 95

Schoffeniels, E., (1955)

Influence du pH sur le transport actif de sodium à travrs la peau de grenouille.

Arch. Int. Physiol. Biochem. 63, 517

Singer, I., M. M. Cavan, (1971)

Effects of anions on sodium transport in toad urinary bladder

Am. J. Physiol. 221/4, 1019

Smith, T. C., W. D. Hughes, E. G. Huf, (1971)

Movement of CO_2 and HCO_3^- across isolated frog skin.

BBP, 225, 77

Tasaki, I., I. Singer, T. Takenaka, (1963)

Effects of internal and external ionic environment on excitability of squid giant axon.

J. Gen. Physiol. 40, 1095

Ussing, H. H., (1949)

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.

Acta physiol. Scand. 17, 1

Ussing, H. H., K. Zerahn, (1951)

Active transport of Na as the source of electric current
in the short circuited isolated frog skin.

Acta physiol. Scand. 23, 110

Ussing, H. H., (1960)

The frog skin potential.

J. Gen. Physiol. 42, 135

Vøet, A., (1957)

Chem. Rev. 20, 169

Wathington, C. O., W. R. Harlan, (1969)

Ion transport and lipid content of isolated frog skin.

Am. J. Physiol. 217/4, 1004

Zadunaisky, J. A., F. W. DeFisch, (1964)

Active and passive chloride movements across isolated
amphibian skin.

Am. J. Physiol. 207/5, 1010

Zadunaisky, J. A., (1972)

Sodium activation of chloride transport in the frog cornea.

BBA, 282, 255

Zerahn, K., (1956)

Oxygen consumption and active sodium transport in the
isolated and short circuited frog skin.

Acta physiol. Scand. 36, 300

Lebenslauf

- Am 18. 5. 1940 als Sohn des Chirurgen Dr. med. Walter Schneider und seiner Ehefrau Dr. med. Lotte, geb. Greßler, in Speyer/Rhein geboren.
- 1945 - 1949 Besuch der Volksschule
bis 1948 in Speyer, 1949 in Bad-Dürkheim
- 1950 - 1959 Besuch des Humanistischen Gymnasiums in
Neustadt/Weinstr.
- 1959 Praktikum in der BASF/Ludwigshafen
- 1960 - 1967 Studium an der Technischen Hochschule München,
2 Semester Elektrotechnik
12 Semester Physik
Diplomarbeit am Physikalisch-Chemischen Institut
über das Thema: "Verbesserung einer Apparatur zur
Messung von Polarisationsgradspektren und ihre Er-
probung an Schwefel-Heterozyklen."
- Seit 1968 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistenten-
stelle im Physiologischen Institut der Univer-
sität München
- 1970 - 1972 Arbeit an der Dissertation
- Seit 1972 verheiratet mit Edith Schneider, geb. Meder.

